



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**CONTRIBUCIÓN AL ESTABLECIMIENTO DE LA TECNOLOGÍA
DE CULTIVO LARVARIO DEL CALLO DE HACHA *Atrina maura*
MEDIANTE LA ADECUACIÓN DE LA DIETA, FOTOPERIODO Y
USO DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

Raúl Cruz Cosío

La Paz, Baja California Sur, enero de 2026.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11:00 horas del día 15 del Mes de diciembre del 2025, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

Contribución al establecimiento de la tecnología de cultivo larvario del callo de hacha *Atrina maura* mediante la adecuación de la dieta, fotoperiodo y uso de microorganismos probióticos.

Presentada por el alumno:

Raúl Cruz Cosío

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

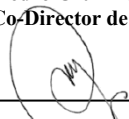
LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Pedro Cruz Hernández
Co-Director de Tesis



Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Co-Director



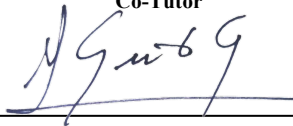
Dra. María Concepción Lora Vilchis
Co-Tutor



Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra
Co-Tutor



Dr. Emigdio Marín Enríquez
Co-Tutor



**Dra. Alejandra Nieto Garibay,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos**



La Paz, Baja California Sur, a 16 de diciembre de 2025.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante Raúl Cruz Cosío del Programa de Doctorado en Ciencias en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
iThenticate
- Filtros utilizados:
Material bibliográfico
Coincidencia baja
Material citado
- Porcentajes de similitud:
Máximo 20% para tesis
Posgrado
Se muestra captura de pantalla

 **iThenticate®**

Identificación de reporte de similitud: oid:3117:539124182

- 6% de similitud general
- Excluir del Reporte de Similitud
 - Material bibliográfico
 - Coincidencia baja (menos de 15 palabras)
 - Material citado

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

• 6% Base de datos de Internet	• 0% Base de datos de publicaciones
• Base de datos de Crossref	• Base de datos de contenido publicado de Crossref

Co-Directores


Dr. Pedro Cruz Hernández


Dr. Ángel Isidro Campa Córdova

Estudiante


Raúl Cruz Cosío

Personal técnico de asesoría en el análisis


Ana María Talamantes Cota

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Pedro Cruz Hernández
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Director de Tesis

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Director de Tesis

Dra. María Concepción Lora Vilchis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Tutora de Tesis

Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Tutor de Tesis

Dr. Emigdio Marín Enríquez
Facultad de Ciencias del Mar SECIHTI- Universidad Autónoma de Sinaloa
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Pedro Cruz Hernández
Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Dra. María Concepción Lora Vilchis
Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra
Dr. Emigdio Marín Enríquez

Jurado de Examen

Dr. Pedro Cruz Hernández
Dr. Ángel Isidro Campa Córdova
Dra. María Concepción Lora Vilchis
Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra
Dr. Emigdio Marín Enríquez

Suplentes

Dr. Eduardo Quiroz Guzmán
Dra. Cristina Escobedo Fregoso

Resumen

La acuicultura de *Atrina maura* es una actividad de creciente interés en el noroeste de México; sin embargo, la producción de semilla en laboratorio se ve limitada por las mortalidades masivas durante el cultivo larvario, los efectos del cambio climático y la aplicación de protocolos acuícolas extrapolados de otras especies. El presente estudio tiene como objetivo contribuir al establecimiento de la tecnología de cultivo larvario de *Atrina maura* mediante la adecuación secuencial de la dieta, fotoperiodo y el uso de microorganismos probióticos. El estudio se desarrolló en varias fases experimentales utilizando reproductores colectados en la Ensenada de La Paz (ELP) y Bahía Magdalena (BM). El desove se indujo mediante shocks térmicos, alternando la temperatura del agua entre 15 y 25°C. Se realizaron análisis macroscópicos e histopatológicos para evaluar el estado gonadal y la condición sanitaria de los reproductores. Durante el cultivo larvario inicial se evaluaron tres dosis de *Isochrysis galbana* (5,000, 10,000 y 20,000 cel·mL⁻¹). Posteriormente, se comparó el rendimiento larvario con dietas de *I. galbana* y *Pavlova lutheri*, así como la ingesta de microalgas de distinto tamaño celular (*I. galbana*, *P. lutheri*, *Chaetoceros calcitrans* y *C. muelleri*), tanto íntegras como fragmentadas. Finalmente, se aisló y evaluó in vivo la cepa bacteriana C29 como potencial probiótico sobre el rendimiento larvario. Los análisis revelaron una melanización de los tejidos en los reproductores a nivel macroscópico (ELP: 36.7 %; BM: 100%) e histológico (ELP: 62.7 %; BM: 33.3 %) como respuesta inmune ante infecciones parasitarias por helmintos, organismos tipo *Rickettsia* y *Perkinsus*, afectando el acondicionamiento, la inducción a desove en un 80 % y dando lugar a gametos atrésicos. La dosis alimenticia óptima alcanzó un nivel de saturación $\geq 10,000$ y $< 20,000$ cel·mL⁻¹, siendo la dosis media la que promovió el mayor crecimiento larvario. La microalga *P. lutheri* indujo un crecimiento significativamente superior en comparación con *I. galbana*, destacando la importancia del tamaño celular y de una adecuación nutricional específica. La ingestión de microalgas se relacionó directamente con la talla larvaria, favorecida por partículas de menor tamaño. El fotoperiodo influyó significativamente en el crecimiento, con la luz continua (24:0) como la condición que promovió mayores tallas en altura y longitud, sin influir significativamente en la supervivencia. Asimismo, la cepa bacteriana C29 incrementó significativamente la supervivencia y el crecimiento larvario respecto al control, lo que sugiere un efecto benéfico asociado a la modulación microbiana o al aporte nutricional directo. En conjunto, estos resultados proporcionan bases experimentales clave para el diseño de protocolos de cultivo larvario específicos para *Atrina maura*.

Palabras clave: Melanización, dosis microalgal, tamaño de partícula, ingestión, co-cultivo.

Orcid iD: <https://orcid.org/0009-0002-9188-2442>.

Vo.Bo. Co-Directores de Tesis



Dr. Pedro Cruz Hernández



Dr. Ángel I. Campa Córdova

Summary

The aquaculture of *Atrina maura* is an activity of increasing interest in northwestern Mexico; however, hatchery seed production is constrained by mass mortalities during larval culture, the effects of climate change, and the application of aquaculture protocols extrapolated from other species. The present study aims to contribute to the establishment of larval culture technology for *Atrina maura* through the sequential optimization of diet, photoperiod, and the use of probiotic microorganisms. The study was conducted in several experimental phases using broodstock collected from Ensenada de La Paz (ELP) and Bahía Magdalena (BM). Spawning was induced through thermal shocks by alternating water temperature between 15 and 25°C. Macroscopic and histopathological analyses were performed to evaluate gonadal status and the sanitary condition of broodstock. During the initial larval culture, three feeding doses of *Isochrysis galbana* (5,000, 10,000, and 20,000 cells·mL⁻¹) were evaluated. Subsequently, larval performance was compared using diets of *I. galbana* and *Pavlova lutheri*, as well as the ingestion of microalgae with different cell sizes (*I. galbana*, *P. lutheri*, *Chaetoceros calcitrans*, and *C. muelleri*), both whole and fragmented. Finally, the bacterial strain C29 was isolated and evaluated in vivo as a potential probiotic for larval performance. Analyses revealed tissue melanization in broodstock at both the macroscopic (ELP: 36.7%; BM: 100%) and histological levels (ELP: 62.7%; BM: 33.3%), as an immune response to parasitic infections by helminths, Rickettsia-like organisms, and *Perkinsus*. These conditions negatively affected broodstock conditioning and resulted in an 80% reduction in spawning induction, leading to the production of atretic gametes. The optimal feeding level reached a saturation range of $\geq 10,000$ and $< 20,000$ cells·mL⁻¹, with the medium dose promoting the highest larval growth. The microalga *P. lutheri* induced significantly greater growth compared to *I. galbana*, highlighting the importance of cell size and species-specific nutritional requirements. Microalgal ingestion was directly related to larval size and was favored by smaller particle sizes. Photoperiod significantly influenced larval growth, with continuous light (24:0) promoting greater shell height and length, although no significant effect on survival was observed. Additionally, bacterial strain C29 significantly increased larval survival and growth compared to the control, suggesting a beneficial effect associated with microbial modulation or direct nutritional contribution. Overall, these results provide key experimental foundations for the development of species-specific larval culture protocols for *Atrina maura*.

Keywords: Melanization, microalgal dose, particle size, ingestion, coculture.

Orcid iD: <https://orcid.org/0009-0002-9188-2442>.

Vo.Bo. Co-Directores de Tesis



Dr. Pedro Cruz Hernández



Dr. Ángel I. Campa Córdova

Dedicatoria

Con todo mi cariño y gratitud

*A mi esposa, cuyo amor, paciencia y apoyo incondicional me
acompañaron en cada etapa de este camino.*

*A mis padres, quienes, con su esfuerzo, ejemplo y enseñanzas
hicieron posible que hoy alcance esta meta.*

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. (CIBNOR), por brindar las instalaciones y el respaldo académico necesarios para el desarrollo de esta investigación. Al personal administrativo de la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del CIBNOR, por su disposición permanente y la forma amable y eficiente con la que atendieron cada una de nuestras solicitudes. A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el apoyo económico otorgado a través de la Beca Nacional 2022 (No. 784003).

Al proyecto *“Valoración de tecnología de producción de semillas de bivalvos en el sector social”* (20454), por financiar esta investigación. Responsable: Dr. Pedro Cruz Hernández.

A mi Director de tesis, Dr. Pedro Cruz Hernández, por su guía constante y su compromiso genuino con mi formación. Agradezco profundamente su apoyo, confianza y disposición para acompañarme en cada etapa de este trabajo. Su ejemplo profesional y humano ha contribuido de manera significativa a mi crecimiento académico y personal. A mi Co-Director, el Dr. Ángel Isidro Campa Córdova, por su orientación y valiosas contribuciones que enriquecieron el desarrollo de esta investigación. A mi comité tutorial: a la Dra. María Concepción Lora Vilchis, por su guía y sugerencias durante los análisis de ingestión larvaria; al Dr. Pedro Enrique Saucedo Lastra, por sus acertadas y valiosas recomendaciones; y de manera especial al Dr. Emigdio Marín Enríquez, por su valioso apoyo en los análisis estadísticos y por acompañarme en mi formación profesional desde licenciatura.

Al personal técnico del CIBNOR, M. en C Delfino Barajas y M. en C. José Luis Ramírez por su apoyo durante el acondicionamiento de reproductores, desoves y cultivos larvarios. Al Ing. Julián Garzón Favela y al Ing. Octavio Atilano Ramírez del Laboratorio de Microalgas por su disposición y trabajo constante en la producción de microalgas para mis experimentos. A las Dras. Norma Angélica Ochoa Álvarez y María del Carmen Rodríguez Jaramillo, por su gran apoyo durante el procesamiento microbiológico e histológico respectivamente, y por la calidez con la que reciben a sus estudiantes. A Eulalia Meza, por su contribución en el proceso histológico y al Dr. Jesús Martín Ramírez Orozco, por su apoyo y capacitación durante el trabajo microbiológico y para la fragmentación de las microalgas.

A mi compañero y amigo Eduardo Miranda por su colaboración durante los muestreos y por hacer más amenos los días de trabajo.

Al acuicultor Luis Tirado, por su invaluable aportación de reproductores de callo de hacha.

A mi esposa, por su amor, apoyo incondicional y por ser fuente constante de motivación en los días difíciles.

A mis padres por creer siempre en mí y por acompañarme en cada paso.

Gracias por ser parte de este proceso.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Biología y hábitat	4
2.2 Pesquerías y cultivo	6
2.3 Flotabilidad larvaria	9
2.4 Patología bacteriana en moluscos bivalvos y probióticos como alimento	9
2.5 Alimentación de larvas	12
2.6 Inducción al desove	14
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVOS	17
5.1 Objetivo general	17
5.2 Objetivos particulares	17
6. MATERIAL Y MÉTODOS	18
6.1 Origen de los reproductores	18
6.2 Acondicionamiento de los reproductores	19
6.3 Inducción a desove	20
6.3.1 Análisis macroscópico	22
6.3.2 Análisis histopatológico y desarrollo gonadal femenino	22
6.3.3 Análisis semicuantitativo	23
6.4 Evaluación de la calidad de los gametos	24
6.5 Procedimiento para la fecundación	24
6.6 Desarrollo embrionario	25
6.7 Cultivo larvario	25
6.7.1 Dosis microalgal–desarrollo larvario	25
6.7.1.1 Cuantificación de microalgas residuales	26
6.7.2 Dieta monoalgal–desarrollo larvario	26
6.7.3 Índice de ingestión	26
6.7.3.1 Fragmentación de microalgas	27
6.7.4 Fotoperíodo–desarrollo larvario	27
6.7.5 Evaluación de la cepa bacteriana seleccionada en larvas de <i>A. maura</i>	28
6.7.6 Longitud celular de las microalgas	28
6.7.7 Medición del crecimiento y la supervivencia larvaria	28
6.8 Aislamiento, caracterización y selección <i>in vitro</i> de bacterias	29
6.8.1 Bioensayos <i>in vitro</i>	30
6.8.1.1 Obtención de organismos, sedimento y microalga	30

6.8.1.2 Aislamiento de microorganismos.....	30
6.8.1.3 Caracterización morfológica de las colonias	30
6.8.1.4 Purificación de cepas.....	31
6.8.1.5 Tinción de Gram	31
6.8.1.6 Confirmación preliminar del género <i>Vibrio</i>	31
6.8.1.7 Actividad antagónica	32
6.8.1.8 Actividad hemolítica.....	32
6.8.1.9 Conteo y ajuste de UFC	33
6.8.1.10 Co-cultivo microorganismo-microalga	33
6.9 Bioensayo <i>in vivo</i>	34
6.9.1 Evaluación del efecto de la cepa bacteriana C29 en el crecimiento y supervivencia larvaria de <i>A. maura</i>	34
6.10 Análisis estadístico	34
7.RESULTADOS	36
7.1 Inducción al desove	36
7.1.1 Análisis macroscópico	36
7.1.2 Análisis histopatológico.....	37
7.1.3 Escala de daño histopatológico.....	38
7.1.4 Descripción de las lesiones histopatológicas	40
7.1.5 Degeneración gonadal	44
7.2 Dosis microalgal-desarrollo larvario.....	45
7.3 Dieta monoalgal–desarrollo larvario.....	48
7.4 Índice de ingestión	50
7.5 Fotoperiodo-desarrollo larvario.....	55
7.6 Bioensayos <i>in vitro</i>	57
7.6.1 Aislamiento y purificación de cepas bacterianas	57
7.6.2 Caracterización inicial de las cepas seleccionadas.....	57
7.6.3 Interacción microalga-bacteria	58
7.7 Bioensayos <i>in vivo</i>	63
7.7.1 Efecto de la cepa C29 en el desarrollo larvario de <i>A. maura</i>	63
8. DISCUSIÓN.....	65
8.1 Acondicionamiento e inducción del desove de los reproductores.....	65
8.2 Dosis, dieta e índice de ingestión.....	68
8.3 Fotoperiodo-desarrollo larvario.....	72
8.4 Interacción bacteria-microalgas-larvas	73
9. CONCLUSIONES.....	77
10. LITERATURA CITADA	79
11. ANEXOS	92
Anexo A: Artículo Publicado.- GENERALIZED MELANIZATION AND HISTOPATHOLOGICAL OBSERVATIONS IN BROODSTOCK OF PEN SHELL <i>Atrina maura</i>	92
Anexo B: Artículo Sometido.-Microalgal cell-size drivers feeding efficiency in pen shell <i>Atrina maura</i> larvae: Implications for aquaculture.	102

Lista de figuras

Figura 1. Callo de hacha <i>Atrina maura</i>	4
Figura 2. Mapa representativo de la distribución geográfica del callo de hacha <i>Atrina maura</i>	5
Figura 3. Avisos de arribo CONAPESCA de callo de hacha de <i>Pinna rugosa</i> , <i>Atrina maura</i> , <i>A. tuberculosa</i> , y <i>A. oldoydii</i> (captura en peso de callo), durante el período 2000-2016 (modificado de DOF, 2018).....	6
Figura 4. Áreas de colecta de reproductores de <i>Atrina maura</i>	18
Figura 5. Sistema de acondicionamiento de flujo abierto. A) Suministro de agua de mar filtrada. B) Suministro de microalgas. C) Tanque de 1,500 litros. D) Bomba. E) Dispensador de agua de mar y microalgas. F) Taras plásticas. G) Desagüe.....	19
Figura 6. Sistema de acondicionamiento con recirculación de agua. A) Suministro de agua de mar filtrada. B) Suministro de microalgas. C) Tanque de 1,000 litros. D) Bomba. E) Dispensador de agua de mar y microalgas. F) Taras plásticas. G) Retorno de agua de mar.	20
Figura 7. Desnatadora de leche utilizada para la concentración de microalgas.	27
Figura 8. Mediciones utilizadas en larvas de bivalvos.	29
Figura 9. Melanización de reproductores de <i>Atrina maura</i> . (A) Organismos sin melanización. (B) Organismo con melanización parcial y (C y D) organismos con melanización total. La flecha roja indica inflamación del manto.....	37
Figura 10. Frecuencia de los niveles de lesiones en reproductores de <i>Atrina maura</i> de la Ensenada de La Paz y Bahía Magdalena.	40
Figura 11. Microfotografías de la respuesta inmunitaria en <i>Atrina maura</i> . (A) Células cafés agregadas en el tejido del manto; (B) Células cafés agregadas en el riñón; (C, D) Melanización en el tejido del manto. Secciones de parafina con hematoxilina y eosina (A, B, D) y Fontana-Masson (C); CC = células cafés; MEL = melanización. La flecha amarilla indica células cafés fagocitando la melanina observada en el epitelio del manto.....	41
Figura 12. Microfotografías que muestran infecciones parasitarias en <i>Atrina maura</i> . (A y B) ilustran un helminto (HEL) dentro de la gónada, (C) muestra un HEL en el manto. (D y E) muestran organismos tipo Rickettsia (OTR) en el manto, y (F) muestra OTR en el estómago. (G) muestra organismos similares a Perkinsus (OTP).....	43
Figura 13. Microfotografías de secciones histológicas de gónadas femeninas de <i>Atrina maura</i> . Secciones de parafina, tinción con hematoxilina y eosina; OA = ovocitos atrésicos; CC = células cafés; MTL = material tipo lipofuscinas; OPV = ovocitos postvitelogénicos; OV = ovocitos vitelogénicos.....	44
Figura 14. Frecuencias relativas de las distintas etapas de desarrollo de los ovocitos y atresia en organismos de <i>Atrina maura</i> de la Ensenada de La Paz (lotes 1 y 2) y Bahía Magdalena (lotes 3 y 4). OG = oogonias; OP = ovocitos previtelogénicos; OV = ovocitos vitelogénicos; OPV = ovocitos postvitelogénicos; OA = ovocitos en atresia.	45
Figura 15. Efecto de la dosis de microalgal en larvas de <i>Atrina maura</i> durante el cultivo larvario. Mediana, percentiles 25 y 75 %, mínimo, máximo y valores atípicos (puntos negros) de A) altura promedio de la concha (μm), B) largo promedio de la concha (μm) y C) tasas de supervivencia (%). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos por día	47
Figura 16. A) Valor promedio de la microalga residual ($\text{cel}/\text{mL}^{-1}$) en cada tratamiento, expresado como porcentaje del alimento suministrado (<i>Isochrysis galbana</i>) durante el cultivo larvario de <i>Atrina maura</i> . Las barras verticales de error denotan la desviación estándar. B) Distribución del	

tamaño celular de <i>I. galbana</i> . La línea vertical punteada denota el tamaño celular hipotético adecuado de las microalgas que ingieren las larvas de <i>A. maura</i>	48
Figura 17. Crecimiento larvario de <i>Atrina maura</i> alimentadas con dos dietas diferentes a base de las microalgas: <i>Isochrysis galbana</i> (ISO) y <i>Pavlova lutheri</i> (PAV). Mediana, percentiles 25 y 75 %, mínimo, máximo y valores atípicos de A) altura de la concha (μm), B) longitud de la concha (μm), C) tasas de supervivencia larvaria (%) y D) tamaño celular de cada microalga (μm) durante el periodo de cultivo. Las letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos por día de valuación ($P < 0.05$).	50
Figura 18. Ingestión de microalgas en larvas de <i>Atrina maura</i> (10 $\times$). Larvas veliger de dos días alimentadas con (A) <i>Isochrysis galbana</i> y (B) <i>Pavlova lutheri</i> . Larvas umbonadas tempranas (11 días) alimentadas con (C) <i>Chaetoceros muelleri</i> y (D) <i>C. muelleri</i> fragmentada. Larvas umbonadas (15 días) alimentadas con (E) <i>Chaetoceros calcitrans</i> y (F) <i>Pavlova lutheri</i>	53
Figura 19. Figuras de efectos parciales del Modelo Aditivo Generalizado (MAG) de la proporción de larvas de <i>Atrina maura</i> que ingirieron especies de microalgas (imagen superior) en relación con la altura de la concha de las larvas (imagen inferior). Las áreas sombreadas indican intervalos de confianza del 95 % en torno a las funciones suavizadas ajustadas.	55
Figura 20. Efecto del fotoperiodo en el crecimiento y supervivencia larvaria de <i>Atrina maura</i> . Mediana, percentiles 25 y 75 %, mínimo, máximo y valores atípicos de A) altura de la concha (μm), B) longitud de la concha (μm) y C) tasas de supervivencia larvaria. Las letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos por día de valuación ($P < 0.05$).	56
Figura 21. Prueba de antagonismo por el método de estría cruzada. Las líneas verticales corresponden a las cepas patógenas: <i>Vibrio algynolyticus</i> (va), <i>Vibrio parahemolyticus</i> (vp). Las líneas horizontales en el centro de la caja corresponden a la cepa en prueba, en este caso C29.	58
Figura 22. Evaluación del crecimiento microalgal en el co-cultivo in vitro de la microalga <i>Isochrysis galbana</i> con las cepas bacterianas C26 y C29. Las barras de error denotan la desviación estándar y los asteriscos diferencias significativas entre tratamientos por día.	59
Figura 23. Evaluación del crecimiento microalgal en el co-cultivo in vitro de la microalga <i>Chaetoceros calcitrans</i> con las cepas bacterianas C26 y C29. Las barras de error denotan la desviación estándar y los asteriscos diferencias significativas entre tratamientos por día.	60
Figura 24. Evaluación de la concentración de UFC mL^{-1} en co-cultivo con las microalgas <i>Isochrysis galbana</i> y <i>Chaetoceros calcitrans</i> . Las barras de error denotan la desviación estándar y los asteriscos diferencias significativas entre tratamientos por día.	61
Figura 25. Concentración de las UFC mL^{-1} de las cepas C26 y C29 inoculadas en medio de cultivo TSB. Las barras de error denotan la desviación estándar.	62
Figura 26. Concentración de las UFC mL^{-1} de las cepas C26 y C29 inoculadas en medio de cultivo de Guillard F/2. Las barras de error denotan la desviación estándar.	62
Figura 27. Evaluación del crecimiento larvario en conjunto con la cepa bacteriana C29. Mediana, percentiles 25 y 75 %, mínimo, máximo y valores atípicos de A) altura de la concha (μm), B) longitud de la concha (μm) y C) tasas de supervivencia larvaria (%) durante el periodo de cultivo. Las letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos por día de valuación ($P < 0.05$).	64

Lista de tablas

Tabla 1. Estudios relacionados con aspectos biológicos y de producción acuícola de <i>Atrina maura</i>	8
Tabla 2. Análisis macroscópico y prevalencia de melanización en reproductores de <i>Atrina maura</i> . NID = Sexo no identificado; ELP = Ensenada de La Paz; BM = Bahía Magdalena.	36
Tabla 3. Prevalencia (%) de lesiones histopatológicas en tejidos de <i>Atrina maura</i>	38
Tabla 4. Índice de ingestión de larvas veliger-umbonadas de <i>Atrina maura</i> en relación con el tamaño celular de las microalgas. Altura promedio larvaria (APL), Ingestión larvaria (IL), Tiempo de alimentación (TA).	50
Tabla 5. Grados efectivos de libertad (gle) y valores p para los términos suavizados del Modelo Aditivo Generalizado (GAM) de la ingestión larval de <i>Atrina maura</i> , categorizado por la especie de microalga, el tamaño de partícula y la altura promedio de la concha larval.	54
Tabla 6. Caracterización fenotípica y funcional de las cepas bacterianas seleccionadas, incluyendo tinción de Gram, morfología, crecimiento en TCBS, actividad hemolítica, antagonismo, UFC y origen.	58

1.INTRODUCCIÓN

Ante el incremento de la población mundial, la acuicultura se presenta como una alternativa prometedora para satisfacer la creciente demanda de alimentos de calidad (Brugère y Ridler 2004). En 2018, esta actividad alcanzó una producción global de 114.5 millones de toneladas, de las cuales 17.7 millones correspondieron a la producción de moluscos, principalmente bivalvos. Dentro de este grupo, más del 70% de la producción está representado por ostras, almejas, vieiras y mejillones (FAO, 2020).

La acuicultura de bivalvos es considerada una de las formas más sostenibles de producción de alimentos, con potencial para convertirse en un pilar esencial en la seguridad alimentaria futura (Summa *et al.*, 2022). Además, los precios elevados y constantes de estos organismos han impulsado la expansión de su cultivo en diversas regiones, consolidándolo como una actividad económicamente viable en términos de inversión, mercado y rentabilidad (Campa *et al.*, 2011; INAPESCA, 2012).

En México, la región noroeste concentra la mayor producción acuícola de bivalvos, enfocada principalmente en el ostión japonés *Crassostrea gigas*. Sin embargo, existe un creciente interés por incorporar especies nativas del Pacífico mexicano con potencial de cultivo, como el callo de hacha *Atrina maura*. Este bivalvo presenta atributos de alto potencial para su cultivo en el noroeste del país, entre los que destacan su alta demanda y valor económico, termotolerancia y resistencia durante su transporte, entre otras (Maeda, 2008, Escamilla *et al.*, 2017). No obstante, la fuerte presión pesquera ejercida sobre este recurso provocó un deterioro de sus poblaciones naturales, incentivando el interés de los sectores productivo, científico y gubernamental en el desarrollo de técnicas para la producción de semilla en condiciones controladas, con el doble objetivo de garantizar su aprovechamiento comercial y contribuir a su conservación (DOF, 2021).

Pese a este interés, aún no se ha alcanzado un éxito sostenido en la producción de semilla en laboratorio. Los principales desafíos incluyen la obtención de gametos viables mediante desoves inducidos (p. ej., cambios de temperatura, salinidad o adición de gametos maduros) y, sobre todo,

el mantenimiento de altas tasas de supervivencia durante los primeros estadios larvarios (Loo-Mera, 2012; INAPESCA, 2021). En este sentido, conocer la temporada reproductiva de la especie y asegurar reproductores en condiciones óptimas resulta fundamental (Ángel *et al.*, 2015). Factores ambientales asociados al cambio climático, como fluctuaciones de temperatura y calidad del agua, han demostrado reducir la calidad gamética y el éxito reproductivo en otras especies de bivalvos, entre ellas *Ruditapes philippinarum* (Dang *et al.*, 2010), *Mytilus galloprovincialis* (Múgica *et al.*, 2015) y *Tridacna maxima* (Armstrong *et al.*, 2020). Asimismo, bajo condiciones de estrés, bivalvos como *C. virginica* se vuelven más susceptibles a infecciones provocadas por virus, bacterias y protozoarios (Okon *et al.*, 2023).

En sus primeras etapas de vida, los bivalvos presentan un sistema inmunológico inmaduro (Romalde, 2012), lo que los hace especialmente vulnerables a infecciones bacterianas (Farías, 2008). Entre ellas, la vibriosis se reconoce como el principal obstáculo en los criaderos, asociada a enfermedades como la necrosis bacilar y el *spotting*, ocasionadas por diversas especies del género *Vibrio* (*V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. tubiashii* y *V. neptunius*) (Romalde *et al.*, 2010). En este contexto, la aplicación de probióticos ha mostrado resultados prometedores en la prevención de enfermedades bacterianas en moluscos (Macey y Coyne, 2005; Soto-Simental, 2015).

Además de su efecto benéfico sobre la microbiota del medio de cultivo, algunas bacterias probióticas también pueden constituir una fuente directa de alimento para las larvas de bivalvos. Diversos estudios han demostrado que algunas cepas bacterianas son capaces de ser ingeridas por las larvas y aportar nutrientes esenciales, incluyendo ácidos grasos poliinsaturados, aminoácidos y vitaminas del complejo B (Phillips 1984; Yazawa *et al.*, 1988; Russell y Nichols 1999; Nichols, 2003). Esta doble función —nutricional e inmunoestimulante— podría ser particularmente relevante durante las etapas tempranas del desarrollo larvario de *A. maura*, cuando la eficiencia de ingestión de microalgas es limitada.

Durante décadas, la elevada mortalidad larvaria de *A. maura* se ha atribuido principalmente a su comportamiento de flotación, el cual provoca que las larvas permanezcan en la superficie del agua, incrementando el riesgo de desecación o inanición (Robles-Mungaray, 2004; Maeda, 2008).

Factores ambientales como el fotoperiodo regulan los movimientos verticales en la columna de agua y, en consecuencia, influyen en la supervivencia y el crecimiento larvario de diversas especies marinas (Sulkin, 1984; Gosling, 2003; Brierley, 2014; Peharda y Villibic, 2008; Trigos *et al.*, 2018).

Otro factor determinante en la supervivencia larvaria es la alimentación. Los lípidos constituyen la principal fuente de energía, seguidos por proteínas y, en menor medida, carbohidratos (Marshall *et al.*, 2010). Sin embargo, aún existen vacíos de conocimiento en nutrición larvaria de *A. maura*. La formulación de dietas específicas que cubran los requerimientos nutricionales es clave para mejorar el crecimiento y supervivencia, como se ha demostrado en especies como *C. gigas* (Marshall *et al.*, 2010). Asimismo, el tamaño de las microalgas y la capacidad de ingestión larvaria influyen directamente en el crecimiento (Lora y Maeda, 1997). En especies afines, como *A. ventricosus*, *Pteria sterna* y *Tridacna noae*, se ha observado una relación estrecha entre la talla larvaria y el tamaño de las microalgas ingeridas, lo que subraya la necesidad de evaluar este aspecto en *A. maura*, donde aún no se cuenta con dietas ni dosis alimenticias específicas, pues los protocolos aplicados en *A. maura* corresponden en gran medida a adaptaciones de los diseñados para otras especies (Escamilla, *et al.*, 2017).

Dada la importancia de *A. maura* en la región noroeste de México y los beneficios potenciales de optimizar la dieta, el fotoperiodo y el uso de microorganismos potencialmente probióticos, resulta necesario profundizar en su estudio. Estos aspectos podrían ser determinantes para mejorar la tecnología de cultivo larvario, aumentar la supervivencia y el crecimiento, y alcanzar los niveles de producción de semilla que demanda el mercado regional y nacional.

2. ANTECEDENTES

2.1 Biología y hábitat

El callo de hacha *A. maura* (Sowerby, 1835) (Fig. 1), es un molusco bivalvo perteneciente a la familia Pinnidae. Se conoce comúnmente como “callo de hacha”, “hacha china”, “hacha de riñón” o “hacha media luna”, nombre que se le da en relación con la forma de su músculo abductor o “callo” (Ahumada *et al.*, 2002; Brusca y Brusca, 2002; Camacho *et al.*, 2014).



Figura 1. Callo de hacha *Atrina maura*.

Se distribuye desde Baja California hasta el norte de Perú (Keen, 1971) (Fig. 2), son organismos bentónicos que habitan en zonas intermareales en bahías protegidas con fondos arenosos de limo y arcilla desde el límite inferior de la marea hasta los 45 m de profundidad y se les puede encontrar enterrados o semi enterrados, adheridos a rocas o restos de conchas. Su dieta consiste principalmente de diatomeas, microflagelados, protozoarios y detritus orgánico (Cardoza y Maeda, 1997; Ángel *et al.*, 2007; Ángel-Dapa, 2015). La morfología exterior de las conchas presenta “espinas” y su forma asemeja a un abanico de valvas alargadas y triangulares con borde truncado-redondeado (Camacho *et al.*, 2014). Por lo general los organismos adultos presentan

una talla de 20-30 cm, aunque la talla máxima reportada es de 45 cm de altura de la concha (Poutiers, 1995).



Figura 2. Mapa representativo de la distribución geográfica del callo de hacha *Atrina maura*.

Anteriormente esta especie era considerada como gonocórica; sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que *A. maura* es una especie protándrica, lo que implica que maduran primero como machos y posteriormente cambian de sexo a hembras en función de la variación de los factores ambientales (Camacho *et al.*, 2014).

Por otro lado, se ha documentado que la temperatura tiene una influencia determinante en los ciclos reproductivos y gonádicos de *A. maura* en Laguna Ojo de Liebre, Bahía Magdalena y la Ensenada de La Paz, pues se menciona que existe un cese del desove durante los meses de agosto-noviembre cuando la temperatura supera los 25 °C en Bahía Magdalena y la Ensenada de La Paz, con un porcentaje elevado de gónadas de ambos sexos en proceso de reabsorción (Camacho *et*

al., 2012), similar a lo reportado anteriormente en condiciones controladas (Rodríguez-Jaramillo, 2004).

2.2 Pesquerías y cultivo

El callo de hacha es uno de los recursos pesqueros más valiosos de la región noroeste de México, gracias a la gran demanda y al precio que alcanza en el mercado nacional (Gómez-Valdez, 2019). Estas características han provocado la intensificación de su extracción en la última década, provocando una disminución en las zonas de pesca y una reducción considerable de la producción total. La pesquería comercial de los callos de hacha alcanzó su pico de producción en 2009 para Baja California Sur, en 2012 para Sonora y en 2016 para Baja California (Fig. 3) (DOF, 2018). Lamentablemente los avisos de arribo CONAPESCA agrupan a diferentes especies de callos de hacha en una misma categoría a pesar de contar con características de vida diferentes, de acuerdo con lo reportado en investigaciones anteriores (Ceballos *et al.*, 2000; Camacho *et al.*, 2012), poniendo en riesgo la sostenibilidad de la pesquería. Los resultados de estas acciones se han reflejado en el fracaso de la administración del recurso por parte de las autoridades en Baja California Sur, en donde las capturas de músculo abductor pasaron de 320 toneladas en 2009 a 23 toneladas en 2022 (CONAPESCA, 2023).

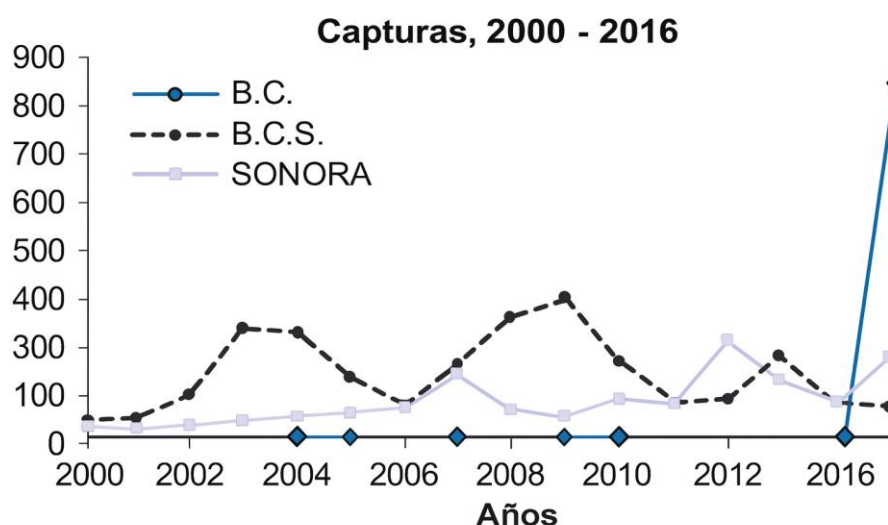


Figura 3. Avisos de arribo CONAPESCA de callo de hacha de *Pinna rugosa*, *Atrina maura*, *A. tuberculosa*, y *A. oldoydii* (captura en peso de callo), durante el período 2000-2016 (modificado de DOF, 2018).

La pesquería de callo de hacha en La Paz Baja California Sur se compone de *A. maura*, *A. tuberculosa* y *Pinna rugosa*. En 2018, las malas prácticas llevaron a la pesquería del callo de hacha de la Ensenada de La Paz al colapso, al grado de suspender la pesquería. En respuesta ante dicha situación, la Asociación Civil Noroeste sustentable (NOS) en conjunto con la comunidad pesquera El Manglito realizaron un esfuerzo comunitario para recuperar la pesquería artesanal. La restauración de la población de callo de hacha en la Ensenada de La Paz es un ejemplo exitoso de restauración de la pesca basada en un enfoque ecológico y social que podría ser adoptado por comunidades pesqueras artesanales similares en América Latina y el mundo (Palacios *et al.*, 2018). Para que este tipo iniciativas generen mejores resultados en un tiempo relativamente corto, es de gran importancia que los laboratorios de producción de semilla de moluscos bivalvos cuenten con una disponibilidad continua de juveniles.

Las características biológicas y económicas del recurso callo de hacha ha impulsado el interés del sector acuícola en desarrollar su cultivo (Maeda, 2008) debido a que es una especie que se adapta fácilmente a vivir en cautiverio, alcanza la madurez gonádica bajo condiciones controladas de alimento y temperatura y es un desovador parcial, el cual expulsa más de 20 millones de ovocitos por desove / hembra. Además, esta especie tolera altas temperaturas, presenta supervivencias entre el 80-90% en cultivos en campo y cuenta con una alta demanda y valor económico a nivel nacional e internacional. (Rodríguez-Jaramillo, 2004; Maeda, 2008; Escamilla *et al.*, 2017; Gómez-Valdez, 2019).

En México, desde la década de los ochenta se han llevado a cabo distintos intentos en busca de la consolidación de su proceso productivo, y no fue hasta la década de los noventa en que se obtuvo la primera producción de juveniles en laboratorio (Escamilla *et al.*, 2017), sin embargo, hasta el día de hoy la tasa de mortalidad elevada durante el proceso de larvicultura, atribuida a diferentes factores entre los que destacan las patologías bacterianas, así como a la falta de protocolos de limpieza y alimentación, ha mantenido las producciones erráticas y limitadas, ya que el número de semillas no ha sido consistente, ni el necesario para poder realizar una actividad acuícola sostenida (Ángel-Dapa, 2015).

En materia de investigación científica, se ha dirigido un esfuerzo en la generación de conocimiento de *A. maura* dirigida de forma particular hacia el desarrollo de una producción pesquera y acuícola sostenible (Tabla 1).

Tabla 1. Estudios relacionados con aspectos biológicos y de producción acuícola de *Atrina maura*.

Tema principal	Referencia
Abundancia y estructura poblacional	Ahumada <i>et al.</i> , 2002
Biología reproductiva	Ángel <i>et al.</i> , 2007; Ángel <i>et al.</i> , 2010; Camacho <i>et al.</i> , 2012; Camacho <i>et al.</i> , 2014; Camacho <i>et al.</i> , 2014b; Ángel-Dapa, 2015; Ángel <i>et al.</i> , 2015; Gómez-Valdez, 2019
Gametogénesis en condiciones controladas	Enríquez <i>et al.</i> , 2003; Rodríguez-Jaramillo, 2004
Fisiología reproductiva	González-Corona, 2003
Termotolerancia y halotolerancia	Leyva-Valencia, 1999
Desempeño biológico en diferentes regímenes de flujo de agua	Arrieché <i>et al.</i> , 2010
Índice de condición y rendimiento muscular y del manto	Camacho <i>et al.</i> , 2008
Caracterización histoquímica y morfológica de larvas	Robles-Rocha, 2010
Cultivo de semillas y juveniles en campo	Reynoso <i>et al.</i> , 1996; Góngora <i>et al.</i> , 2011; Leal <i>et al.</i> , 2011; Mendo <i>et al.</i> , 2011; Góngora <i>et al.</i> , 2015; Góngora <i>et al.</i> , 2016; Escamilla <i>et al.</i> , 2017.
Producción, crecimiento y supervivencia de larvas y semilla en laboratorio	Robles <i>et al.</i> , 1996; Velasco-Blanco, 1997; Lora <i>et al.</i> , 2004; Goldchain-Goldin 2010; Gómez-Hernández, 2011; Melguizo-Robles, 2011.
Aislamiento de bacterias, uso de probióticos y susceptibilidad larvaria a bacterias	Luna <i>et al.</i> , 2002; Soto-Simental, 2015
Parásitos y lesiones histopatológicas	(Góngora <i>et al.</i> , 2016; Gómez <i>et al.</i> , 2019; Camacho <i>et al.</i> , 2023; Cruz <i>et al.</i> , 2025

2.3 Flotabilidad larvaria

En la década de los ochenta, durante los primeros intentos de producción de semilla de *A. maura* en cautiverio (Ángel-Dapa, 2015), se detectó un cuello de botella en las primeras etapas de desarrollo, que ha sido vinculado con una hidrofobicidad presente en las larvas de la especie, provocando que éstas se adhirieran a la superficie del agua y a las paredes de los tanques de cultivo y murieran por desecación y/o inanición (Maeda, 2008). Esta condición conlleva supervivencias menores al uno por ciento al final de la etapa larvaria (Robles-Mungaray, 2004).

Atendiendo esta problemática Goldchain-Goldin (2010) demostró que las larvas de *A. maura* se encuentran en movimiento constante entre la columna de agua y la superficie, asociando este fenómeno con estrategias naturales de dispersión. Se ha reportado un comportamiento larvario similar en *Pinna nobilis* en ambiente natural, quien realiza migraciones hacia aguas profundas durante el día y regresa a zonas superficiales durante la noche (Peharda y Villibic, 2008). Este fenómeno se conoce como migración vertical diurna y se ha mencionado que los cambios en la intensidad de la luz son probablemente su principal desencadenante (Brierley, 2014). En otros grupos; como es el caso de los crustáceos, se ha demostrado que el fotoperiodo es un factor abiótico que afecta sustancialmente al rendimiento larvario, incluyendo la natación, el comportamiento alimentario y el crecimiento (Sulkin, 1984; Minagawa y Murano, 1993; Minagawa, 1994; Gardner y Maguire, 1998).

A pesar del enorme interés puesto sobre *A. maura* por parte del sector acuícola, aún no se dispone de información sobre los mecanismos que regulan los movimientos larvarios en la columna de agua ni las respuestas conductuales ante variaciones del fotoperiodo en condiciones naturales y/o de cautiverio.

2.4 Patología bacteriana en moluscos bivalvos y probióticos como alimento

Los primeros estudios de enfermedades bacterianas causadas por vibrios se realizaron hace más de 50 años en Estados Unidos. Guillard (1959) demostró la patogenicidad en larvas de almeja

americana (*Mercenaria mercenaria*) de una serie de bacterias, incluyendo *Vibrio sp.*, aisladas a partir de larvas moribundas.

Durante mucho tiempo el cultivo de moluscos bivalvos se ha visto afectado por diferentes patologías del género *Vibrio*, que afectan a larvas y juveniles en los criaderos de producción (Romalde, 2012). Se ha mencionado que este grupo de bacterias forman parte del microbiota habitual de los bivalvos, pudiendo establecer una relación mutualista, comensal, patogénica o simplemente fortuita con el hospedero (Pruzzo *et al.*, 2005).

La necrosis bacilar y spotting son las principales enfermedades ocasionadas por *Vibrio* que afectan a nivel mundial durante las etapas larvarias (Romalde *et al.*, 2010), y se han considerado como la principal causa de mortalidad durante el proceso productivo en los criaderos de bivalvos. De este modo, los vibrios patógenos pueden provocar la mortalidad total de lotes enteros de producción en un periodo corto de tiempo, causando importantes pérdidas económicas (Prado *et al.*, 2005), situación que podría estar sucediendo en los cultivos larvarios de *A. maura*, en dónde la mayoría de las veces la población total se colapsa sin una explicación aparente (Soto-Simental, 2015).

Tomando en cuenta las pérdidas económicas que implican las infecciones bacterianas en los laboratorios de producción, el uso de antibióticos para prevenir la mortalidad de larvas y juveniles era cada vez más frecuente (Luna *et al.*, 2004). Sin embargo, ha existido una preocupación extendida acerca del uso de antibióticos, ya que éstos permiten el surgimiento de bacterias resistentes (Inglis 1996). Un método alternativo al uso de antibióticos y que está ganando aceptación en la acuicultura es el uso de bacterias probióticas para controlar patógenos microbianos (Gómez *et al.*, 2000, Robertson *et al.*, 2000, Balcázar *et al.*, 2006). Los productos probióticos han sido exitosos en la prevención de enfermedades bacterianas en moluscos (Macey y Coyne 2005), peces (Gram *et al.*, 1999, Robertson *et al.*, 2000) y crustáceos (Harzevili *et al.*, 1998, Rengpipat *et al.*, 2000). Entre los efectos benéficos se encuentran un mayor crecimiento, eficiencia en la alimentación y mejoramiento de la respuesta inmune (Venkat *et al.*, 2004). Para obtener una mayor efectividad en el cultivo se recomienda el uso de una mezcla de probióticos provenientes preferentemente de cepas aisladas del huésped (Kesarcodi *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2016).

Varios estudios con probióticos han mostrado un control sobre infecciones generadas por *V. tubiashii* en larvas de *C. gigas* (Gibson *et al.*, 1998), la inhibición de *Vibrio sp.* en larvas de *Pecten maximus* (Ruiz *et al.*, 1999) y *Argopecten purpuratus* (Riquelme *et al.*, 2000), la mejora de la supervivencia en larvas de *C. corteziensis* (Campa *et al.*, 2011), además de una supervivencia de hasta el 55 % durante el primer día de desarrollo larvario de *A. maura*, haciendo uso de la levadura identificada como *Candida parapsilosis* (Soto-Simental, 2015).

Por otro lado, las microalgas utilizadas como alimento vivo para las primeras fases de desarrollo de la mayoría de los organismos cultivados pueden ser una vía de incorporación de bacterias benéficas a los sistemas acuícolas (Elston, 1984) debido a la secreción de sustancias que estimulan el crecimiento bacteriano (Riquelme y Avendaño, 2003). Estas bacterias benéficas son capaces de aportar elementos nutricionales o producir sustancias que inhiben el crecimiento de organismos (Garriques y Arevalo 1995) y bacterias patógenas a través de mecanismos de exclusión competitiva (Austin *et al.*, 1995) o a través de la producción de sustancias bactericidas (Nogami y Maeda 1992). Sin embargo, la interacción bacteria-microalga puede limitar el crecimiento microalgal y viceversa. Sánchez *et al.*, (2020) mencionan que el co-cultivo de *Chaetoceros calcitrans* con bacterias probióticas dio lugar a una reducción significativa del crecimiento de la microalga en comparación con el grupo control sin bacterias, mientras que *Tetraselmis* y diversas especies del género *Chaetoceros* afectan la composición de las comunidades bacterianas por medio de la producción de sustancias antibacterianas (Austin *et al.*, 1992, Viso *et al.*, 1987).

Además de su papel en el control de patógenos y la modulación de la microbiota del sistema de cultivo, las bacterias presentes en el medio acuático pueden representar una fuente importante de nutrientes para los organismos filtradores, incluidos los moluscos bivalvos. En ambientes naturales y de cultivo, el bacterioplancton constituye una fracción significativa de la biomasa orgánica disponible, alcanzando densidades de 10^3 a 10^7 células·mL⁻¹ y representando entre el 10 y 60% de la producción del fitoplancton (Ducklow, 1983; Cole *et al.*, 1988; Ducklow, 2000). Aunque las bacterias libres suelen presentar un tamaño reducido (1–5 µm), limitando su captura individual, pueden ser consumidas eficazmente al encontrarse agregadas en partículas orgánicas o asociadas a fitoplancton, conformando lo que se conoce como “nieve marina” (Porter *et al.*,

1983; Grossart, 2010). La ingestión de bacterias y detritos bacterianos ha sido documentada en diversos grupos acuáticos, incluidos rotíferos, copépodos, crustáceos y bivalvos (Prieur *et al.*, 1990; Arapov *et al.*, 2010). En el caso de los moluscos bivalvos, las bacterias no solo representan una fuente significativa de carbono y proteína, sino también de nutrientes esenciales como ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), vitaminas del complejo B y ácidos grasos ramificados característicos de origen bacteriano (Phillips, 1984; Nichols, 2003; Russell y Nichols, 1999). De esta manera, el bacterioplancton y las bacterias probióticas presentes en los criaderos pueden cumplir una doble función: actuar como agentes benéficos que modulan la microbiota y, simultáneamente, como un recurso alimenticio complementario durante las primeras fases de desarrollo larvario de los bivalvos.

2.5 Alimentación de larvas

La alimentación de las larvas da inicio una vez que se haya desarrollado por completo su sistema digestivo. Algunos autores mencionan que la alimentación es el factor más determinante en el crecimiento y supervivencia de las larvas de bivalvos (Marshall *et al.*, 2010). Por esta razón, las microalgas son utilizadas en la acuicultura como alimento directo de los bivalvos durante las diferentes etapas de su desarrollo (Brown, 2002), siendo las especies más comunes a nivel laboratorio: *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *C. muelleri*, *C. calcitrans*, *Thalassiosira pseudonana* y *Tetraselmis suecica* entre otras, elegidas con base en su valor nutricional, tamaño, tasa de crecimiento elevada y la relativa sencillez para cultivarse a altas densidades (Ponis *et al.*, 2006).

El valor alimenticio de un alga en particular viene determinado no sólo por su composición bioquímica sino también por su ingestibilidad y digestibilidad (Helm *et al.*, 2006). Los mejores resultados se obtendrán mediante el suministro de una dieta de alto valor nutritivo y tamaño de célula adecuado, las cuales suelen contener proporciones relativamente altas de ácidos grasos como el ácido eicosapentaenóico (EPA) y ácido docosahexaenóico (DHA) en comparación con muchas de las especies de valor alimenticio pobre (Helm *et al.*, 2006).

Las distintas especies de diatomeas que se cultivan habitualmente en los criaderos tienen niveles de ácidos grasos parecidos, todos ricos en EPA. Las cantidades totales suelen ser más altas en los cultivos que entran en la fase estacionaria que durante el crecimiento exponencial (Helm *et al.*, 2006); sin embargo, se debe prestar atención especial en mantener un buen control microbiológico del alimento que se suministra a los cultivos, pues es en la fase estacionaria en la que el crecimiento bacteriano, incluyendo vibrios, se ve favorecido por los metabolitos y compuestos orgánicos desprendidos por las células senescentes y las que están en descomposición (Berland *et al.*, 1970; Cole, 1982; Riquelme *et al.*, 1987).

Se ha demostrado en algunos estudios que proporcionar una dieta que contenga una mezcla de algas de dos o más especies de alto valor nutritivo, que incluya un flagelado y una diatomea durante el desarrollo inicial, propician resultados favorables en el crecimiento y supervivencia de las larvas y semillas de ostión (Rico *et al.*, 2006; Kheder *et al.*, 2010) mejillón (Pettersen *et al.*, 2010; Sánchez y Martínez, 2014), pectínidos (Carvalho *et al.*, 2013; Saucedo *et al.*, 2013) y almejas (Liu *et al.*, 2009; Contreras *et al.*, 2014).

Por otro lado, es bien sabido que gran parte de los costos operacionales en la producción de semillas de moluscos bivalvos se asocian al cultivo de microalgas. Esto genera el interés y la necesidad hacia el estudio y desarrollo de estrategias más eficientes y rentables en el uso y administración de este recurso en los laboratorios de producción (Farías y Uriarte, 2002). Además de los estudios que demuestran un beneficio en el crecimiento y supervivencia larvaria de algunos bivalvos con el uso de dietas mixtas, existe también la contra parte en donde la dieta monoalgal basada en *Isochrysis* sp resultó ser muy equilibrada nutricionalmente para el crecimiento y supervivencia larvaria de *Panopea generosa* (Montes-Orozco, 2014) y *Clinocardium nuttalli* (Liu *et al.*, 2009), en esta última sin encontrar diferencias significativas con el uso de 10 dietas monoalgales y mixtas. Se ha informado también, que *Isochrysis* sp es un alimento de alto valor nutricional para las larvas de muchas especies de bivalvos de importancia comercial. Con base en estos antecedentes, es clara la necesidad en la investigación de las preferencias alimenticias y necesidades nutricionales para cada especie cultivada.

2.6 Inducción al desove

La inducción al desove es un paso esencial para la producción de semillas de bivalvos, que implica conocer los periodos reproductivos de la especie de interés con el fin de obtener gametos y larvas viables (Parwadani, 2011). Los métodos utilizados para potencializar la inducción al desove van desde estímulos físicos como los cambios repentinos de temperatura y salinidad, estímulos mecánicos como la exposición al aire libre previo al desove, el incremento de la concentración de alimento en el agua y el producido por shocks eléctricos; estímulos químicos como la adición de cloruro de potasio, peróxido de hidrógeno y la inyección de monoaminas como serotonina, dopamina y norepinefrina, o la inyección de esteroides sexuales (Lewis *et al.*, 1998; Parwadani, 2011) hasta los estímulos biológicos, como la introducción de gametos maduros en el agua (Ellis, 1997; Parwadani, 2011). La efectividad de cada uno de los métodos varía dependiendo de la especie, estado de madurez y las condiciones ambientales de su acondicionamiento previo (Loo-Mera, 2012).

Cuando los pasos anteriores no han dado resultado, o bien como una variante más, una forma de obtener gametos de bivalvos es mediante la disección del tejido gonadal o “stripping” de machos y hembras, siendo una práctica muy común en ostras (*C. gigas*, *C. virginica*, *C. rhizophorae*), la cual implica el sacrificio de cierto número de organismos (Boudry, 2008; Gosling, 2003; Helm *et al.*, 2006) y una producción menos abundante de larvas que con un desove natural (Gosling, 2003).

El método más utilizado para la inducción al desove de *A. maura* es por shocks térmicos y en ocasiones combinado con la adición de gametos al agua (Reynoso *et al.*, 1996; Robles-Mungaray, 2004, Goldin-Goldchain, 2010; Robles-Rocha, 2010; Ángel-Dapa, 2015).

3. JUSTIFICACIÓN

El cultivo larvario de moluscos bivalvos representa una etapa particularmente crítica dentro de la acuicultura, debido a que la supervivencia y el crecimiento temprano determinan de manera directa el éxito productivo. En especies de alto valor comercial como *A. maura*, estos desafíos se acentúan, ya que aún no se ha logrado establecer protocolos de producción de semilla que permitan obtener tasas de supervivencia y crecimiento comparables a las reportadas para otros bivalvos cultivados. A pesar del creciente interés comercial y ecológico por esta especie, persisten limitaciones técnicas que han impedido consolidar su cultivo a escala comercial.

Una de las principales causas de estas dificultades radica en que los esquemas actuales de manejo y alimentación larvaria de *A. maura* se han extrapolado a partir de protocolos diseñados para otros bivalvos, sin considerar las particularidades biológicas de la especie, como su comportamiento larvario y requerimientos nutricionales diferentes que, hasta ahora, no han sido abordadas mediante estudios específicos. Este vacío de conocimiento limita la capacidad de mejorar las técnicas de cultivo y de incrementar la eficiencia en la producción de semilla.

Ante este panorama, se vuelve necesario explorar alternativas que, por un lado, optimicen la nutrición larvaria y, por otro, fortalezcan la resistencia de las larvas frente a patógenos oportunistas presentes en los sistemas de cultivo. Entre estas alternativas destacan el uso de dietas ajustadas al tamaño de ingestión larvaria, la evaluación de factores ambientales clave como el fotoperiodo y la incorporación de microorganismos con potencial probiótico capaces de mejorar la salud larvaria y, potencialmente, aportar nutrientes esenciales.

El presente estudio se plantea como una contribución fundamental para cubrir estas lagunas de conocimiento. Su desarrollo permitirá generar información biológica aplicada directamente al cultivo de *A. maura*, establecer estrategias de manejo basadas en las necesidades reales de la especie y, en última instancia, mejorar la supervivencia y el desempeño larvario. Esto no solo fortalecerá la capacidad de producción de semilla en laboratorio, sino que también impulsará la consolidación de la acuicultura regional mediante el aprovechamiento sustentable de un recurso nativo de alto valor económico y ecológico.

4. HIPÓTESIS

Con base en las mortalidades larvarias masivas que se presentan durante el proceso productivo de semilla de *A. maura* en laboratorio y a la falta de conocimiento sobre los requerimientos específicos durante su cultivo, en el presente estudio se plantea la siguiente hipótesis: la optimización del acondicionamiento gonádico de reproductores, el ajuste de parámetros como la dieta, el fotoperiodo y el uso de microorganismos probióticos durante las primeras etapas de desarrollo de la especie, incrementarán la tasa de supervivencia y crecimiento larvario de *A. maura* de manera significativa.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Contribuir al establecimiento de la tecnología de cultivo larvario de *Atrina maura* mediante la adecuación secuencial de la dieta, fotoperiodo y el uso de microorganismos probióticos.

5.2 Objetivos particulares

1. Inducción del desove de organismos adultos de *Atrina maura* madurados en campo y acondicionados en laboratorio.
2. Evaluar el efecto de diferentes dosis alimenticias sobre el crecimiento y la supervivencia larvaria de *A. maura*.
3. Analizar el crecimiento y la supervivencia de larvas de *A. maura* alimentadas con dietas monoalgales a base *I. galbana* y *P. lutheri*.
4. Determinar el índice de ingestión larvaria de *A. maura* alimentada con microalgas de diferente tamaño celular.
5. Evaluar el efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento y la supervivencia de las larvas de *A. maura*.
6. Aislar, caracterizar y seleccionar microorganismos con potencial probiótico obtenidos de ejemplares adultos de *A. maura*, del sedimento y de la microalga *I. galbana* mediante pruebas *in vitro*.
7. Evaluar el crecimiento en co-cultivo de los microorganismos potencialmente probióticos seleccionados con las microalgas *I. galbana* y *C. calcitrans* mediante ensayos *in vitro*.
8. Evaluar el efecto de los microorganismos potencialmente probióticos seleccionados sobre la supervivencia y el crecimiento larvario del callo de hacha *A. maura* mediante pruebas *in vivo*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Origen de los reproductores

Los ejemplares de *A. maura* se obtuvieron de dos localidades diferentes: la Ensenada de La Paz (ELP) (ubicada entre los 24° 06' y 24° 11' N y 110° 19' y 110° 26' O) y Bahía Magdalena (BM) (ubicada entre los 25° 0' y 24° 47' de N y 112° 9' y 112° 4' O) (Fig. 4)

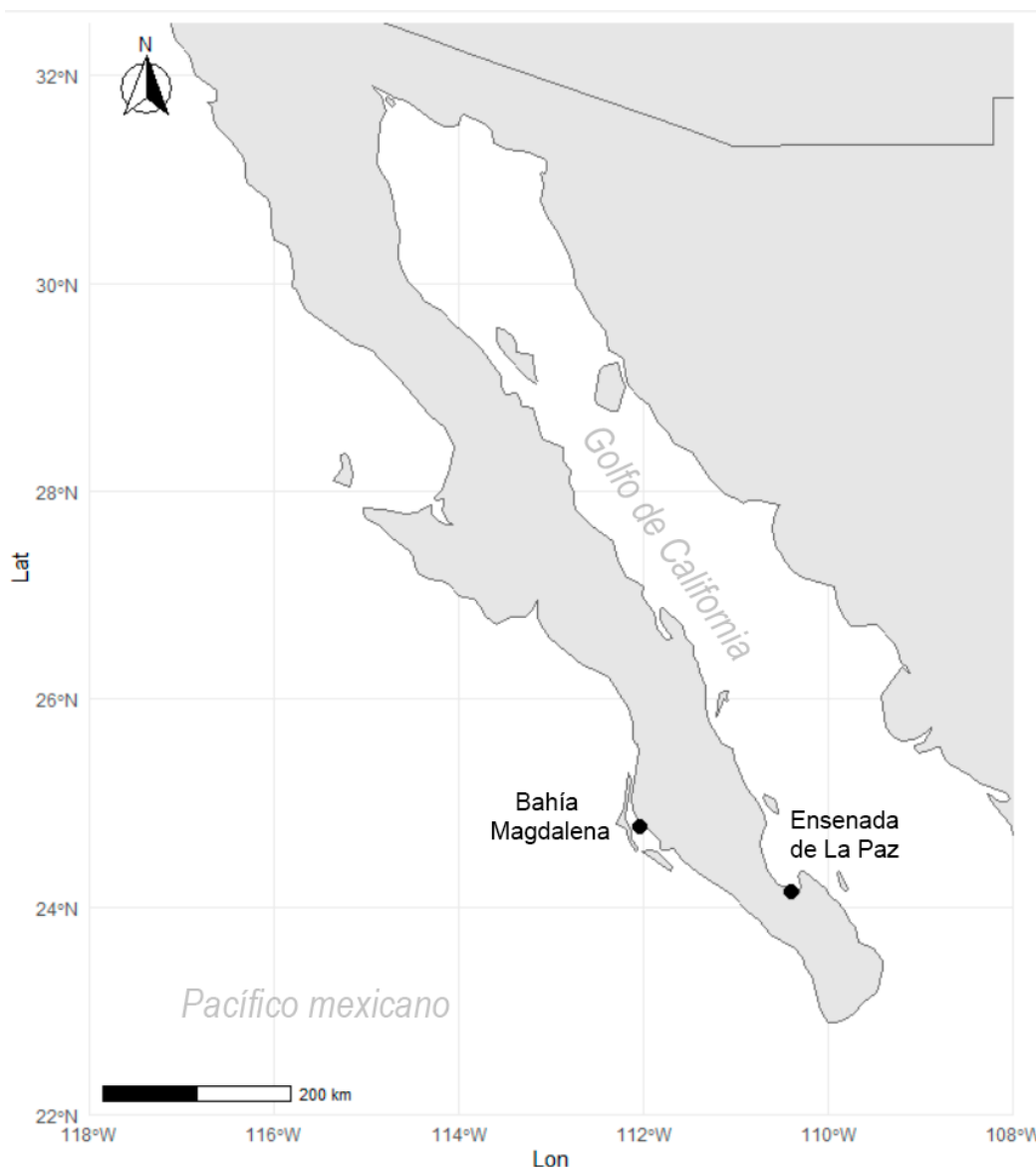


Figura 4. Áreas de colecta de reproductores de *Atrina maura*.

Durante el primer semestre del año del periodo 2023-2025, se colectaron un total de 88 organismos (2023: 65; 2024: 15; 2025: 8) mediante buceo semi autónomo (Camacho-Mondragón, 2014; Ángel *et al.*, 2015). Se procuró colectar un intervalo amplio de tallas (12-30 cm de longitud) con el objetivo de asegurar la captura de organismos de ambos sexos, disminuyendo la

probabilidad de obtener organismos en transición sexual de macho a hembra, ya que, de acuerdo con Camacho *et al.*, (2014), *A. maura* es una especie que presenta segregación de tallas con respecto al sexo, catalogándola como hermafrodita protándrica.

6.2 Acondicionamiento de los reproductores

El acondicionamiento de los reproductores se llevó a cabo por medio de dos sistemas. Durante la primera temporada (2023) se realizó a través de un sistema de flujo abierto con seis taras plásticas de 60 L (5 organismos c/u) y un reservorio de 1500 L (Fig. 5). La calidad del agua se garantizó mediante el uso de un filtro de arena sílica, filtros de cartucho y luz ultravioleta. Para favorecer la gametogénesis, la temperatura del agua de mar se mantuvo a 20 ± 1 °C (Rodríguez-Jaramillo, 2004) y fueron alimentados con una mezcla 1:1 de *I. galbana* y *C. calcitrans* a una concentración aproximada de $240,000 \text{ cel/mL}^{-1}$ (INAPESCA, 2021). La limpieza del sistema de taras se realizó previo al recambio de agua por medio de sifoneo, mientras que el tanque reservorio se lavó con ácido muriático al 10% y agua corriente. El acondicionamiento de los organismos estuvo dividido en cuatro lotes, dos lotes secuenciales (febrero-mayo) provenientes de ELP (25 y 16 organismos, respectivamente) y posteriormente de mayo a junio dos lotes de BM (16 y 8 reproductores, respectivamente).

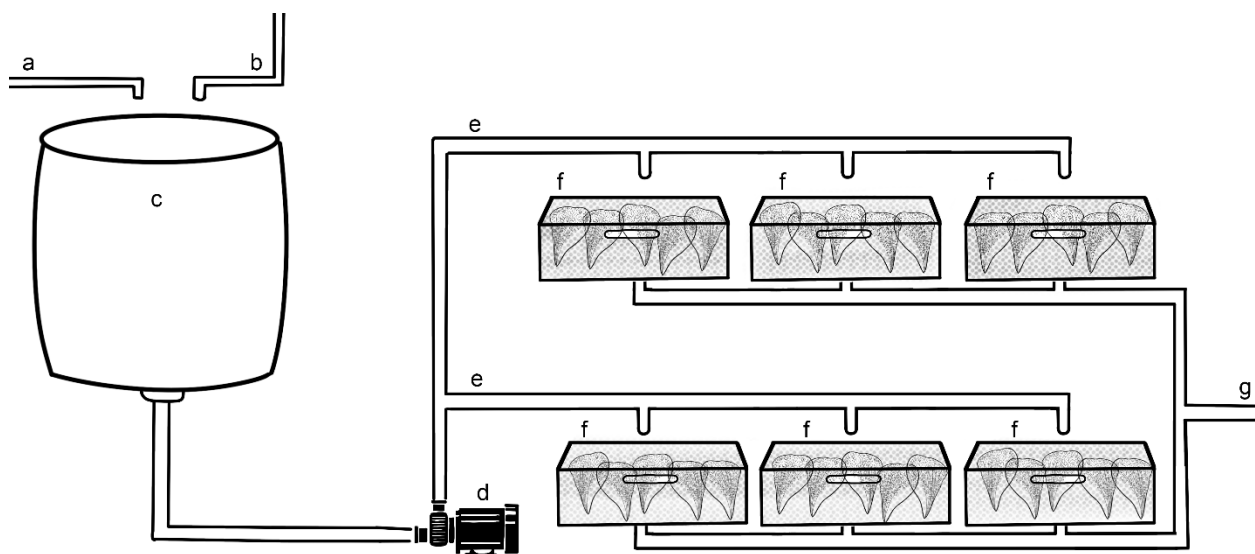


Figura 5. Sistema de acondicionamiento de flujo abierto. A) Suministro de agua de mar filtrada. B) Suministro de microalgas. C) Tanque de 1,500 litros. D) Bomba. E) Dispensador de agua de mar y microalgas. F) Taras plásticas. G) Desagüe.

Durante la segunda y tercera temporada (2024: 15 organismos - 2025: 8 organismos), se utilizó un sistema de acondicionamiento cerrado con recirculación de agua (Fig. 6). Durante este periodo, los reproductores fueron alimentados con una mezcla *I. galbana* and *C. calcitrans* (1:2) a una concentración de 1.5×10^{10} células/ organismo⁻¹/ día⁻¹.

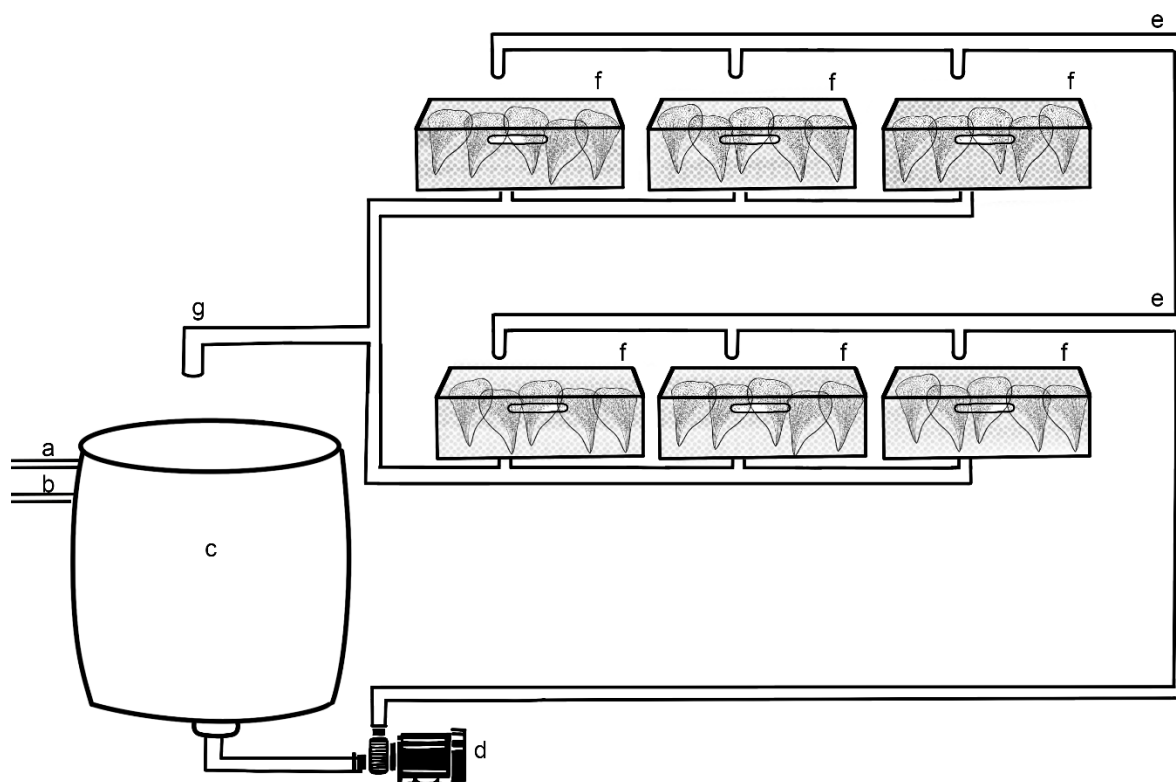


Figura 6. Sistema de acondicionamiento con recirculación de agua. A) Suministro de agua de mar filtrada. B) Suministro de microalgas. C) Tanque de 1,000 litros. D) Bomba. E) Dispensador de agua de mar y microalgas. F) Taras plásticas. G) Retorno de agua de mar.

En todos los casos el periodo de acondicionamiento fue de un promedio de un mes, y estuvo determinado por una evaluación visual de la maduración sexual, basada en la observación del tamaño, color y textura de las gónadas. La madurez fue considerada cuando las gónadas presentaban una textura densa y suave con la coloración característica de cada sexo (machos: blanquecina; hembras: anaranjado-rojo).

6.3 Inducción a desove

El método utilizado para inducir al desove fue por shock térmico, el cual consiste en someterlos a un cambio repentino en la temperatura del agua (INAPESCA, 2021).

Los eventos de desove se llevaron a cabo en 10 ocasiones durante el periodo de febrero a junio de 2023. Se realizaron seis desoves con reproductores provenientes de ELP: dos con organismos recolectados directamente del ambiente natural y cuatro con organismos acondicionados previamente en laboratorio, conforme al protocolo descrito anteriormente. Asimismo, se efectuaron cuatro desoves con organismos de BM: dos con individuos del campo y dos con organismos mantenidos en laboratorio.

Para los periodos 2024 y 2025, se realizaron tres y una inducción respectivamente. En todos los casos se utilizaron organismos provenientes de BM previamente acondicionados en laboratorio.

Debido al número limitado de ejemplares disponibles en el medio natural, no fue posible sacrificar organismos para verificar el estado de madurez gonadal previo al desove; por lo tanto, se utilizaron todos los ejemplares disponibles en cada evento de inducción.

Previo a la inducción al desove, los organismos se lavaron meticulosamente para retirar la epifauna adherida a la concha. Posteriormente, los organismos fueron colocados en posición vertical en cubetas de 20 litros de capacidad con agua a 15°C durante 20-30 minutos. Pasado este tiempo, se colocaron inmediatamente a una cubeta con agua a 25 °C por 20-30 minutos más. El número de ciclos fríos y templados necesarios para inducir el desove fue determinado por el estado de madurez de los gametos y de que los reproductores estuviesen preparados para desovar. En caso de ser necesario se aplicaron estímulos adicionales con ovocitos o espermatozoides obtenidos manualmente. Este procedimiento consistió en sacrificar un organismo, al cual se le extrajo la gónada y por medio de un pequeño corte o rasgado de la misma se obtuvieron los gametos y se colocaron en agua de mar filtrada para posteriormente ser añadidos a las cubetas de los reproductores en proceso de inducción al desove. En los casos en que los organismos no respondieron al estímulo en un periodo de dos o tres horas, se transfirieron a un tanque de 1,500 L, en donde permanecieron hasta el día siguiente. Posteriormente, los organismos se trasladaron al área de acondicionamiento y maduración gonádica (Helm *et al.*, 2006). En algunos casos, los reproductores fueron sacrificados para observar su condición de madurez gonádica mediante histología.

6.3.1 Análisis macroscópico

Debido a la baja respuesta observada de los organismos a los ensayos de inducción al desove durante 2023, se realizó un análisis macroscópico de los reproductores de *A. maura* con el propósito de evaluar su estado gonadal y de salud. Se analizaron un total de 47 organismos, de los cuales 30 procedían de ELP y 17 de BM. El sexo se determinó visualmente, identificando a las hembras por la coloración anaranjada-rojiza de la gónada, mientras que los machos presentaron una gónada de tonalidad blanquecina.

Los organismos sacrificados para el análisis macroscópico fueron fotografiados individualmente para su identificación y registro, poniendo especial atención a la condición de melanización macroscópica de sus órganos, la cual varió desde la ausencia de melanización hasta una pigmentación generalizada en los tejidos.

6.3.2 Análisis histopatológico y desarrollo gonadal femenino

Se realizó un análisis histopatológico en un total de 42 organismos de *A. maura*, de los cuales 27 provenían de ELP y 15 de BM. El objetivo fue clasificar el avance en madurez gonádica y determinar la prevalencia de lesiones, parásitos y anomalías histológicas presentes en los tejidos blandos de los organismos.

Se extrajeron pequeñas porciones (aproximadamente 5 mm) de los tejidos blandos —gónada, manto, glándula digestiva, estómago, branquias y riñón—, las cuales fueron fijadas en solución de Davidson durante 24 horas. Posteriormente, las muestras se enjuagaron con etanol al 50% en agua de mar filtrada y se conservaron en etanol al 70%.

La deshidratación se realizó mediante un procesador de tejidos ASP 200S (Leica) utilizando una serie ascendente de etanol (70%, 80%, 90%, 96% y 100%). Las muestras se aclararon con xileno y fueron incluidas en Paraplast X-TRA (Sigma-Aldrich) con un centro de inclusión EG1150H y EG1150C (Leica). Posteriormente, se realizaron cortes de 4 μ m de espesor con un micrótopo rotatorio 2155 (Leica).

Las secciones fueron teñidas con Hematoxilina de Harris y Eosina-Floxina (H&E) según el protocolo descrito por Sheehan y Hrapchak (1980). Además, se aplicó la tinción de Fontana-Masson (Kit KT014-IFU, Diagnostic BioSystems) para evaluar el grado de melanización en los tejidos analizados.

El estado gonadal se evaluó exclusivamente en hembras (ELP = 10; BM = 5), debido a que la mayoría de los organismos femeninos presentaron una condición reproductiva menos favorable antes y durante el proceso de acondicionamiento, en comparación con los machos.

La frecuencia de los distintos tipos de ovocitos —ovogonias, previtelogénicos, vitelogénicos, postvitelogénicos y atrésicos— se determinó mediante el análisis digital de tres imágenes por muestra capturadas a 40× de aumento, utilizando un microscopio óptico Leica DM4B y el software Leica LAS para su procesamiento y cuantificación.

6.3.3 Análisis semicuantitativo

La condición de melanización macroscópica observada en los reproductores de *A. maura* se clasificó de manera semicuantitativa mediante una escala de tres niveles, en la cual, 1) no se observó melanización; 2) se presentó melanización parcial en los tejidos (principalmente en manto y/o músculo) y 3) se observó una melanización intensa o generalizada en los tejidos.

La intensidad de las lesiones histopatológicas —células cafés (CC), melanización (MEL), infiltración hemocítica (IH), helmintos (HEL), organismos tipo *Rickettsia* (OTR) y organismos tipo *Perkinsus* (OTP)— fue evaluada con base en el porcentaje del área afectada en las secciones histológicas digitalizadas. Las imágenes fueron analizadas utilizando el software Image-Pro Premier v.9.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

La clasificación se realizó siguiendo la escala arbitraria propuesta por Villalba *et al.*, (1993) para lesiones inflamatorias en *M. galloprovincialis*, con modificaciones. El nivel de intensidad del daño se asignó de acuerdo con un enfoque tipo cuantil, de la siguiente manera:

- (0) = sin daño (0%),

- (1) = leve ($\leq 25\%$),
- (2) = moderado (25–75%),
- (3) = severo ($>75\%$).

6.4 Evaluación de la calidad de los gametos

Para evaluar la calidad de los gametos, se tomó una muestra con una pipeta y se observó bajo un microscopio óptico a un aumento de 10x-20x. Se prestó atención especial a los ovocitos de aquellas hembras que desovaron durante el primer ciclo de inducción (17-27 °C) y que además desovaron chorros de ovocitos bien separados y no en racimos o grumos, ya que estos últimos no se fecundan bien debido a que permanecen menos tiempo en suspensión (Helm *et al.*, 2006). Se eligieron aquellos que adquirieron una forma esférica minutos después de estar en contacto con el agua de mar. Con respecto a los espermatozoides, se eligieron aquellos que presentaron una movilidad alta, lo cual es un indicador de calidad.

6.5 Procedimiento para la fecundación

Derivado de la evaluación de los gametos, se identificaron los ovocitos y espermatozoides de por lo menos una hembra y un macho que presentaron las mejores características de calidad para continuar con la fertilización.

Antes de dar inicio al proceso de fecundación, se tamizaron suavemente los ovocitos a través de una malla de 60 micras y se filtró el esperma a través de una malla de 30 micras para eliminar desechos fecales y cualquier residuo de tamaño mayor, generado por los reproductores durante el desove, reduciendo el riesgo de una proliferación bacteriana durante el proceso de cultivo larvario.

En seguida se colocaron los ovocitos en una cubeta con agua de mar a 27 °C, se homogenizó la mezcla de agua y espermatozoides, se tomaron aproximadamente 70 mL y posteriormente se agregaron en la cubeta de los ovocitos. Inmediatamente después se agitó lentamente la mezcla de gametos y se tomó una muestra para observarla al microscopio. Se evaluó la cantidad de espermatozoides presentes en la periferia de cada ovocito, ajustando la cantidad 15:1

espermatozoides/ovocito (INAPESCA, 2021). Es importante ser cauteloso durante este paso, pues un exceso de espermatozoides es motivo de poliespermia, que se traduce en deformación y mortalidad durante la primera etapa del desarrollo larvario. Una vez ajustada la proporción espermatozoides/ovocitos, se revisaron continuamente muestras homogenizadas durante 20-30 minutos hasta la aparición del primer cuerpo polar por lo menos en el 80% de la muestra.

6.6 Desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario se llevó a cabo en tanques de fibra de vidrio de 1000 L con agua de mar a 27 °C, aireación moderada constante, y una densidad de 7-10 óvulos/ml (INAPESCA, 2021). Este proceso tuvo una duración aproximada de 20-22 horas. Transcurrido este periodo, se tomaron muestras, las cuales fueron observadas con ayuda de un microscopio óptico a un aumento de 10x-20x con el fin de corroborar la formación exitosa de larvas de charnela recta o larvas D.

6.7 Cultivo larvario

Los cultivos larvarios se iniciaron con una densidad de 5 larvas·mL⁻¹, utilizando agua de mar filtrada a 1 µm, esterilizada con luz ultravioleta (UV) y manteniendo aireación continua. El sistema de cultivo se mantuvo a una temperatura controlada entre 24 y 26 °C y una salinidad de 37–38 ‰.

Se realizaron reemplazos totales de agua y limpieza de los tanques cada 48 horas, procurando mantener condiciones óptimas para el desarrollo larvario y minimizando la acumulación de materia orgánica y desechos.

6.7.1 Dosis microalgal–desarrollo larvario

Se evaluaron tres concentraciones de *I. galbana*: baja (5,000 células·mL⁻¹), media (10,000 células·mL⁻¹) y alta (20,000 células·mL⁻¹; control). Cada tratamiento incluyó nueve réplicas (n = 27) empleando tanques de fibra de vidrio de 50 L.

6.7.1.1 Cuantificación de microalgas residuales

Se cuantificó diariamente la concentración residual de microalgas. Para ello, se tomó una muestra de 1 mL del centro de cada tanque experimental, la cual fue fijada con formaldehído al 2% y posteriormente contada en una cámara de Neubauer mediante microscopía óptica.

6.7.2 Dieta monoalgal–desarrollo larvario

Se evaluaron dos tratamientos con tres réplicas cada uno ($n = 6$): uno utilizando *I. galbana* (control) y otro con *P. lutheri*, ambos suministrados a una concentración de 15,000 células·mL⁻¹. El experimento se llevó a cabo en tanques de fibra de vidrio de 1,500 L, manteniendo las condiciones ambientales descritas previamente para los cultivos larvarios.

6.7.3 Índice de ingestión

La ingestión larvaria se evaluó mediante fluorescencia intestinal en larvas expuestas a *I. galbana*, *P. lutheri*, *C. calcitrans* y *C. muelleri* (intactas y fragmentadas). Se realizaron bioensayos de corta duración desde el estadio D-larva (día 1) hasta el estadio umbonado (día 15).

Previo a cada ensayo, las larvas fueron mantenidas durante 2–6 horas en agua de mar filtrada para favorecer el vaciado intestinal. Posteriormente, muestras duplicadas (10 larvas·mL⁻¹) se incubaron en frascos de 1L, con aireación continua y una concentración de 100,000 células·mL⁻¹ de cada microalga probada, durante 1 a 4 horas. Se incluyó un control sin microalgas.

Al término de cada prueba, las larvas se fijaron en formaldehído al 2%, y el índice de ingestión se determinó observando 70–100 larvas por tratamiento bajo un microscopio compuesto Zeiss Axio Lab A1 provisto de filtros especiales para detectar fluorescencia ($\lambda = 540\text{--}590$ nm). Se registró el porcentaje de individuos con coloración intestinal rojiza como evidencia de ingestión. Fotografías representativas fueron capturadas a 10× de aumento utilizando la cámara de un teléfono Xiaomi 11 Lite 5G NE.

6.7.3.1 Fragmentación de microalgas

Cada cultivo de microalga fue concentrado utilizando una desnatadora de leche (Fig. 7) genérico (VEVOR, modelo NNJ-F50) que funciona mediante centrifugación a 10,500 rpm. El concentrado obtenido se transfirió a tubos Falcon de 50 mL y se centrifugó durante 15 minutos a 5,000 g (Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific, Alemania).



Figura 7. Desnatadora de leche utilizada para la concentración de microalgas.

El pellet resultante fue resuspendido en tubos Eppendorf de 1.5 mL que contenían aproximadamente 50 mg de esferas de vidrio. La ruptura celular se realizó en un homogeneizador de tejidos FastPrep® durante 3 minutos, divididos en tres ciclos de 1 minuto intercalados con periodos de reposo de 2 minutos. Finalmente, la biomasa fragmentada se resuspendió en agua de mar filtrada hasta alcanzar su volumen original.

6.7.4 Fotoperiodo-desarrollo larvario

Para evaluar el efecto del fotoperiodo en el crecimiento y la supervivencia larvaria de *A. maura*, se establecieron dos tratamientos lumínicos con diferentes regímenes de luz/oscuridad: 12:12 y

24:0 horas, respectivamente. Cada tratamiento contó con tres réplicas, para un total de $n = 6$ unidades experimentales de 200 L. En esta ocasión, se alimentó con *P. lutheri* durante los primeros cuatro días y a partir del quinto día con una mezcla de las microalgas *P. lutheri* e *I. galbana* en una proporción 80:20 y una densidad de 15,000-45,000 cel·mL⁻¹ con reposición de alimento cada 24 horas.

6.7.5 Evaluación de la cepa bacteriana seleccionada en larvas de *A. maura*

Se llevó a cabo un bioensayo compuesto por un tratamiento y un grupo control, cada uno con tres réplicas alojadas en tanques de 200 L. En el tratamiento, se adicionó diariamente la cepa bacteriana C29, aislada de la microalga *I. galbana*, a una concentración de 1×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC).

Las condiciones de alimentación se mantuvieron de acuerdo con lo descrito en la sección 6.7.4, manteniendo además un régimen de luz continua durante todo el experimento.

6.7.6 Longitud celular de las microalgas

Previo a la alimentación larvaria, se recolectaron muestras de 1 mL de cada especie de microalga, las cuales fueron observadas y fotografiadas bajo microscopía óptica (40×). El análisis de imágenes se realizó utilizando el software ImageJ, con el objetivo de determinar la longitud celular de cada microalga.

En el bioensayo de dosis alimenticia, se efectuó una única medición sobre un total de 120 células durante el último día experimental. Posteriormente, se analizaron 30 células por especie para una comparación interespecífica detallada.

6.7.7 Medición del crecimiento y la supervivencia larvaria

Se recolectaron muestras de 1 mL de cada tanque en los días 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 15, según el experimento realizado. La altura y longitud de la concha de 30 larvas seleccionadas aleatoriamente se midieron cada 48 horas utilizando el software Image J (Fig. 8).

La supervivencia larvaria (%) se estimó mediante la fórmula:

$$\%S = \frac{N_f \times 100}{N_i} \quad (1)$$

donde N_f corresponde al número final de larvas y N_i al número inicial de larvas tipo D, de acuerdo con Miranda-Domínguez *et al.*, (2025).

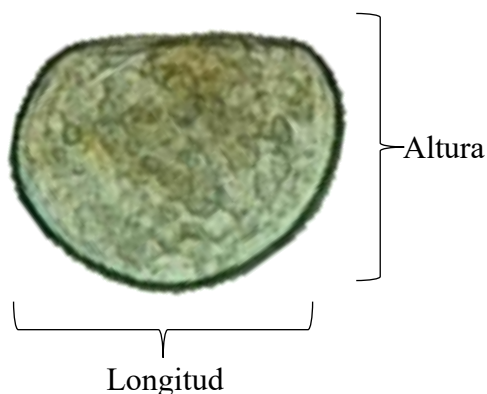


Figura 8. Mediciones utilizadas en larvas de bivalvos.

6.8 Aislamiento, caracterización y selección *in vitro* de bacterias

Se llevó a cabo la selección *in vitro* de cepas bacterianas aisladas a partir de adultos de *A. maura*, sedimento y de los cultivos de las microalgas *I. galbana* y *C. calcitrans*. Las cepas seleccionadas fueron posteriormente evaluadas en co-cultivo con las microalgas mencionadas, así como con larvas de *A. maura*, con el fin de determinar su compatibilidad, capacidad de supervivencia y efectos potenciales sobre el crecimiento larvario.

La metodología general se estructuró en dos fases:

1. Bioensayos *in vitro*, orientados al aislamiento, caracterización morfológica y fisiológica de las cepas bacterianas, así como a la evaluación preliminar de sus propiedades probióticas (antagonismo frente a patógenos, tolerancia a condiciones del medio y compatibilidad con microalgas).
2. Bioensayos *in vivo*, destinados a la validación de las cepas seleccionadas mediante su aplicación en cultivos larvarios experimentales de *A. maura*, con el propósito de evaluar su efecto sobre la supervivencia y crecimiento.

6.8.1 Bioensayos *in vitro*

6.8.1.1 Obtención de organismos, sedimento y microalga

Se utilizaron cinco organismos adultos silvestres provenientes de ELP, adquiridos junto con una muestra de sedimento circundante a través de la Organización de Pescadores Rescatando la Ensenada (OPRE). Las microalgas utilizadas fueron proporcionadas por el laboratorio de producción de alimento vivo del CIBNOR.

6.8.1.2 Aislamiento de microorganismos

La disección de los organismos se realizó bajo condiciones asépticas, separando los principales órganos (glándula digestiva, gónada, branquias) para su posterior procesamiento. Cada tipo de tejido se homogeneizó y maceró por separado, obteniéndose un pool representativo por tipo de órgano a partir de todos los individuos analizados. De igual manera, las muestras de la microalga *I. galbana* y de sedimento se colocaron en tubos Falcon con solución salina estéril al 2.5 %.

A partir de cada homogenizado, se tomó un volumen de 1 mL para realizar diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1000) en tubos Eppendorf con solución salina al 2.5 %. Posteriormente, se efectuó la siembra por el método de dispersión sobre la superficie de placas Petri previamente rotuladas y preparadas con diferentes medios de cultivo sólido:

MRS (Man, Rogosa y Sharpe), selectivo para bacterias ácido lácticas.

YPD (Yeast, Peptone and Dextrose), medio específico para levaduras.

TS (Tryptic Soy) + 2.5 % NaCl, que favorece el desarrollo de bacterias aerobias facultativas.

Las placas se incubaron a 35 °C durante 24 horas en condiciones aerobias. En el caso de las bacterias anaerobias, la incubación se realizó en jarras de anaerobiosis GASPACJ (BBL) a 35 °C durante 48-72 horas.

6.8.1.3 Caracterización morfológica de las colonias

Las colonias bacterianas obtenidas se evaluaron visualmente para registrar sus características morfológicas, incluyendo color, tamaño, forma, borde, elevación y textura. Posteriormente, cada

colonia con morfología distinta fue transferida con un asa bacteriana estéril a nuevas placas mediante el método de estrías cruzadas, utilizando el mismo medio de cultivo en el que fue originalmente aislada. Las placas se incubaron durante 24 horas en condiciones aerobias o anaerobias, según las necesidades fisiológicas de cada cepa.

6.8.1.4 Purificación de cepas

Tras cada periodo de incubación, las colonias resultantes fueron nuevamente resembradas hasta tres veces consecutivas en el medio de cultivo correspondiente, con el propósito de obtener cultivos axénicos.

Una vez verificada la pureza de las cepas, se realizaron cultivos masivos para su conservación individual. Cada cepa aislada se preservó a -80 °C en su respectivo medio de cultivo suplementado con glicerol al 30 %, con el fin de asegurar su viabilidad y disponibilidad para ensayos posteriores.

6.8.1.5 Tinción de Gram

Se realizó la tinción de Gram siguiendo el método descrito originalmente por Gram, 1884 para la diferenciación primaria de los aislados bacterianos. Este procedimiento permitió clasificar cada microorganismo como Gram positivo (Gram+) o Gram negativo (Gram-), de acuerdo con la retención o pérdida del colorante primario durante el proceso.

Adicionalmente, se determinó la morfología celular característica de cada cepa mediante su observación microscópica, registrando las formas típicamente descritas para bacterias: cocos, bacilos, espirilos y espiroquetas (MacFaddin, 2003).

6.8.1.6 Confirmación preliminar del género *Vibrio*

Las cepas bacterianas clasificadas como Gram negativas fueron reactivadas en medio líquido correspondiente al utilizado durante su aislamiento. Tras 24 horas de crecimiento, se sembraron en placas con medio selectivo TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar) con el propósito de

evaluar su posible pertenencia al género *Vibrio*. Un crecimiento positivo en el medio de cultivo TCBS fue utilizado como criterio preliminar para su identificación presuntiva.

6.8.1.7 Actividad antagónica

Para evaluar de manera rápida la actividad antagónica de las cepas bacterianas que dieron negativo a la prueba de crecimiento en TCBS ante microorganismos patógenos (*V. alginolyticus*-T35 y *V. parahaemolyticus*-T13), se empleó por duplicado el método de estría cruzada (Lertcanawanichakul y Sawangnop, 2008). En primer lugar, la cepa bacteriana de interés (previamente reactivada e incubada en TSB + 2.5 NaCl a 35 °C) se sembró mediante una estría central sobre la superficie de la placa de agar y se incubó durante 24 horas a 35 °C. Una vez transcurrido este periodo, las cepas bacterianas patógenas (previamente reactivadas e incubada en TSB + 2.5 NaCl a 35 °C) se inocularon en la misma placa mediante estrías perpendiculares a la estría inicial. Después de sembrar el patógeno, se dieron 48 horas de incubación para observar posibles antagonismos antes de ser descartado.

6.8.1.8 Actividad hemolítica

La actividad hemolítica de los aislados se evaluó siguiendo la metodología descrita por Cowan y Steel's (2009). A partir de cultivos en TSB suplementado con 2.5 % de NaCl, incubados durante 24 horas, se obtuvieron 50 µL de sobrenadante de cada cepa, los cuales se inocularon sobre placas de agar sangre al 10%. Las placas se incubaron a 35 °C y se inspeccionaron a las 24 y 48 horas posteriores.

Tras la incubación, se registró el tipo de hemólisis mediante la observación de halos o cambios de coloración alrededor del área de siembra. Se seleccionaron únicamente aquellas cepas que no presentaron halos hemolíticos, clasificadas como γ -hemolíticas (no hemolíticas) o aquellas incapaces de crecer en agar sangre. En contraste, se descartaron las cepas que mostraron halo de degradación característico de β -hemólisis (hemólisis completa, halo blanquecino), así como aquellas con coloración verdosa alrededor del crecimiento, indicativa de α -hemólisis (hemólisis incompleta).

6.8.1.9 Conteo y ajuste de UFC

El número de UFC por mililitro se determinó a partir de cultivos bacterianos incubados en medio líquido TSB + 2.5 % NaCl por 24 horas a 35 °C. Las células bacterianas fueron colectadas por centrifugación (5,000 x g, 15 min, 4 °C) y el precipitado se resuspendió en solución salina estéril (NaCl 2.5%) para realizar dos lavados bajo las mismas condiciones de centrifugación. Para el conteo celular, la suspensión bacteriana se ajustó a una densidad óptica de 1.0 en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas, de las cuales se sembraron 100 µL por triplicado en placas Petri con TSA suplementado con 2.5 % de NaCl mediante el método de dispersión. Las placas se incubaron a 35 °C durante 24 horas y posteriormente se realizó el conteo de colonias para estimar la concentración bacteriana (UFC mL⁻¹) de cada cepa. Una vez conocido el número de UFC·mL⁻¹, se ajustó la concentración bacteriana (C26, C29) requerida para los tratamientos experimentales según corresponda (1 x 10⁶ UFC·mL⁻¹).

6.8.1.10 Co-cultivo microorganismo-microalga

La interacción *in vitro* entre microorganismos y microalgas se evaluó mediante los siguientes tratamientos: (1) *I. galbana* + C26, (2) *I. galbana* + C29, (3) *C. calcitrans* + C26, y (4) *C. calcitrans* + C29, manteniendo como control las microalgas sin bacterias, y las cepas en medio de cultivo TSB + 2.5 % de NaCl y en medio Guillard F/2. El crecimiento individual y mixto se evaluó por duplicado mediante la inoculación de matraces de vidrio estériles de 250 mL con un volumen final de 150 mL. En los tratamientos con bacterias se adicionaron 1 × 10⁶ UFC·mL⁻¹, mientras que la concentración inicial de las microalgas fue de 3.66 × 10⁵ células·mL⁻¹ para *I. galbana* y 2.98 × 10⁵ células·mL⁻¹ para *C. calcitrans*. Las microalgas se cultivaron en agua de mar estéril enriquecida con medio Guillard F/2 (pH 8, 24.5–26.5 °C) y silicatos para *C. calcitrans*, sin aireación y bajo iluminación continua con lámparas fluorescentes. La densidad celular microalgal se determinó mediante conteo en cámara de Neubauer. Para la cuantificación bacteriana, se tomaron alícuotas de cada matraz y se realizaron diluciones seriadas en solución salina estéril al 2.5%; posteriormente, se sembraron 100 µL de cada dilución por el método de dispersión en agar TSA + 2.5% NaCl, en triplicado, incubando las placas a 35 °C durante 24 h para obtener el número de UFC·mL⁻¹. Las muestras de todos los tratamientos fueron tomadas a los días 2, 4 y 6 de cultivo.

6.9 Bioensayo *in vivo*

6.9.1 Evaluación del efecto de la cepa bacteriana C29 en el crecimiento y supervivencia larvaria de *A. maura*

Como parte de la evaluación *in vivo* de los microorganismos aislados, se seleccionó la cepa bacteriana C29 para realizar un bioensayo con larvas de *A. maura*, con el objetivo de determinar si era capaz de mejorar su supervivencia y crecimiento. Las condiciones específicas del bioensayo se describen en la sección 6.7.5.

6.10 Análisis estadístico

La relación entre la presencia de CC y el grado de melanización macroscópica en los organismos de *A. maura* se evaluó mediante pruebas de independencia χ^2 de Pearson. Para ello, se construyeron tres tablas de contingencia: una que incluyó a todos los individuos recolectados en ambas localidades y dos adicionales correspondientes a cada sitio por separado (ELP y BM).

Con este enfoque se probó la hipótesis nula de que las tablas de contingencia se encontraban relativamente equilibradas, es decir, que la probabilidad de obtener un individuo con un alto nivel de CC y baja melanización macroscópica era similar a la de obtener uno con las características opuestas. El rechazo de la hipótesis nula ($P < 0.05$) indicó una dependencia estadística significativa entre ambas variables. Este análisis se aplicó exclusivamente a los organismos en los que se realizó muestreo macroscópico e histológico de manera simultánea.

Para evaluar las diferencias en el conteo de ovocitos atrésicos entre las diferentes etapas de desarrollo y entre localidades, se aplicaron las pruebas Kruskal–Wallis y ANOVA.

Los datos de crecimiento, supervivencia larvaria y tamaño celular de las microalgas fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis, una vez confirmada la no normalidad y heterocedasticidad de los datos. En los casos donde se detectaron diferencias significativas, se realizaron comparaciones múltiples pareadas utilizando la prueba de Dunn.

Para evaluar el efecto del tamaño celular de las microalgas sobre la ingestión larvaria de *A. maura*, considerando la altura de la concha larvaria, se ajustó un Modelo Aditivo Generalizado (MAG) con distribución binomial y enlace logit. La variable de respuesta correspondió a la proporción de ingestión (Ingestión % / 100), mientras que las variables predictoras incluyeron la altura larvaria y el tamaño celular de la microalga, empleando funciones de suavizamiento.

El efecto de la interacción *in vitro* entre bacterias y microalgas fue evaluada a partir de un análisis paramétrico de T de student. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software R, versión 4.3.0.

7.RESULTADOS

7.1 Inducción al desove

De los diez intentos de inducción al desove durante 2023, únicamente dos (20%) resultaron exitosos. Ambos desoves exitosos provinieron de reproductores recolectados en campo (ELP = 1, BM = 1), mientras que los organismos previamente acondicionados en el laboratorio no respondieron al estímulo de desove.

7.1.1 Análisis macroscópico

Se analizaron 47 ejemplares de callo de hacha a nivel macroscópico. De ellos, 63.83% correspondieron a ELP y 36.17% a BM, con una proporción de 44.70% machos, 40.50% hembras y 10.80% de sexo indeterminado (Tabla 2).

Se identificaron tres niveles de melanización (Fig. 9). En ELP, 63.3% de los organismos no presentaron melanización (nivel 1), mientras que 36.7% mostraron melanización parcial (nivel 2). En contraste, todos los organismos de BM exhibieron melanización intensa (nivel 3) (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis macroscópico y prevalencia de melanización en reproductores de *Atrina maura*. NID = Sexo no identificado; ELP = Ensenada de La Paz; BM = Bahía Magdalena.

Localidad	Organismos por sexo			Nivel de melanización	Prevalencia (%)	
	Machos	Hembras	NID		ELP	BM
ELP	17	13	0	1	63.3	0
BM	6	6	5	2	36.7	0
-	-	-	-	3	0	100

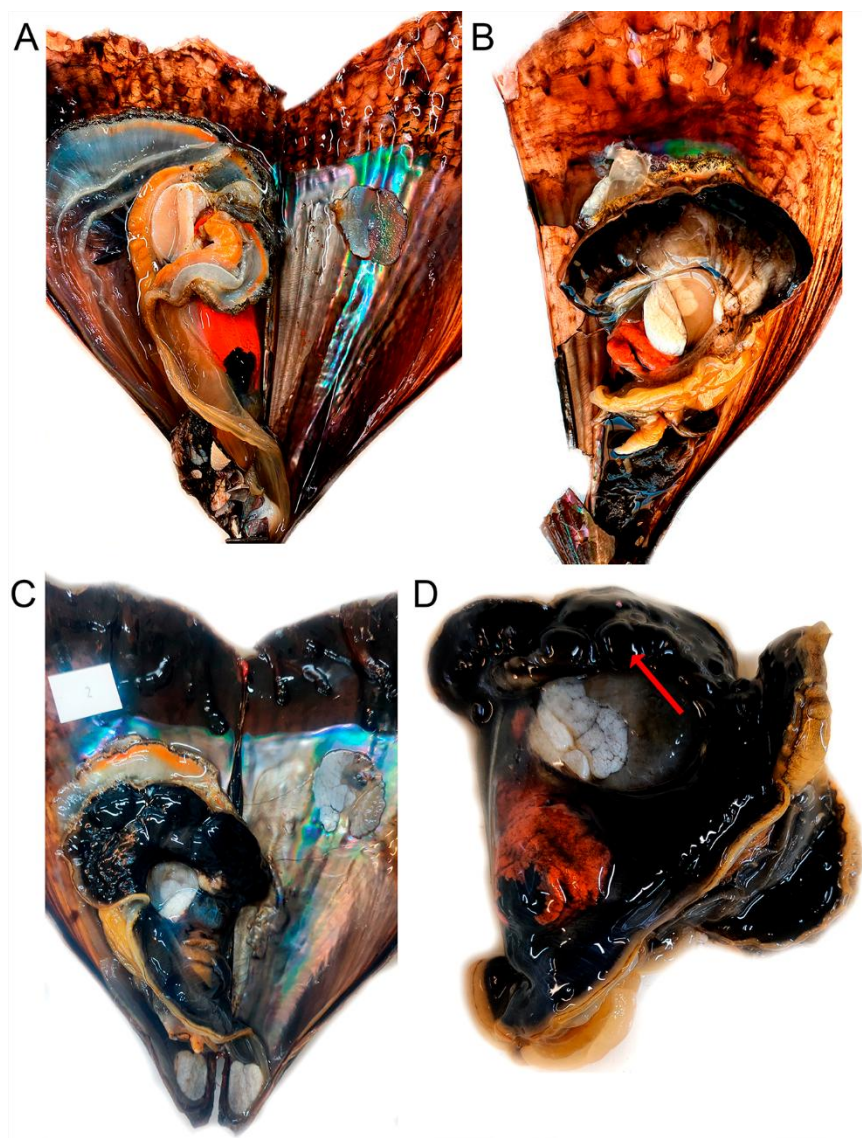


Figura 9. Melanización de reproductores de *Atrina maura*. (A) Organismos sin melanización. (B) Organismo con melanización parcial y (C y D) organismos con melanización total. La flecha roja indica inflamación del manto.

7.1.2 Análisis histopatológico

Las observaciones histológicas evidenciaron actividad inmunitaria en los organismos de *A. maura*, indicada por la presencia de CC en todos los individuos de ambas localidades.

La MEL se observó en 62.96% de las muestras de ELP y 33.33% de las de BM, mientras que la IH se presentó exclusivamente en el grupo de ELP (37%).

Se identificaron tres tipos de parásitos en los tejidos de *A. maura* (Tabla 3). La prevalencia de parásitos de tipo HEL fue de 40.74% en ELP y 26.7% en BM. Los OTR se detectaron en 51.85% de los organismos de ELP y 33.33% de los de BM, mientras que la prevalencia más baja correspondió a OTP, con 14.81% en ELP y 6.66% en BM.

Exceptuando las CC —presentes en todos los organismos—, las lesiones tisulares fueron más frecuentes en las muestras de ELP. El análisis por sexo mostró una mayor prevalencia de indicadores de activación inmunitaria (CC, MEL E IH) y de infecciones parasitarias (HEL, OTR y OTP) en los machos (Tabla 3).

Tabla 3. Prevalencia (%) de lesiones histopatológicas en tejidos de *Atrina maura*.

Alteraciones histopatológicas	Prevalencia (%)				
	Localidad		Sexo		
	ELP	BM	Machos	Hembras	NID
Células cafés	100	100	50	40.5	9.5
Melanización	62.7	33.3	54.5	36.4	9.1
Infiltración de hemocitos	37	0	70	30	0
Helmintos	40.7	26.7	73.3	20	6.7
Organismo tipo <i>Rickettsia</i>	51.9	33.33	47.4	36.8	15.8
Organismo tipo <i>Perkinsus</i>	14.81	6.66	5.4	2.7	0

Ensenada de La Paz (ELP; n = 27, machos: 15, hembras: 12), Bahía Magdalena (BM; n = 15, machos:6, hembras:5, NID: 4). NID corresponde a organismos sin identificación de sexo).

7.1.3 Escala de daño histopatológico

En los organismos de ELP, las CC se observaron con mayor frecuencia (44%) en el nivel leve de daño (nivel 1). En contraste, en los organismos de BM el daño se distribuyó entre nivel moderado (40%) y nivel severo (60%) (Fig. 10A).

La MEL con mayor intensidad (nivel 3) se registró en ELP (20%), mientras que en BM alcanzó solo 10%. En general, 56% de los organismos de ELP presentaron melanización de moderada a severa intensidad (niveles 2–3), mientras que en BM 50% de los individuos no mostraron melanización (Fig. 10B).

La IH se observó únicamente en las muestras de ELP, con distribución en daño leve (16%), moderado (8%) y severo (8%) (Fig. 10C).

La infección por HEL fue leve (nivel 1) en ambas localidades, aunque con mayor frecuencia en ELP (44%) (Fig. 10D). En ELP, la infección por OTR se detectó en los cuatro niveles de daño (0–3), con 40% de las lesiones en nivel moderado (nivel 2). En BM, 30% de los organismos mostraron infecciones moderadas (nivel 2) y 20% severas (nivel 3) (Fig. 10E).

Finalmente, la lesión histopatológica con menor intensidad correspondió a OTP, con 4% de daño severo (nivel 3) y 10% de daño moderado (nivel 2) en ELP y BM, respectivamente (Fig. 10F).

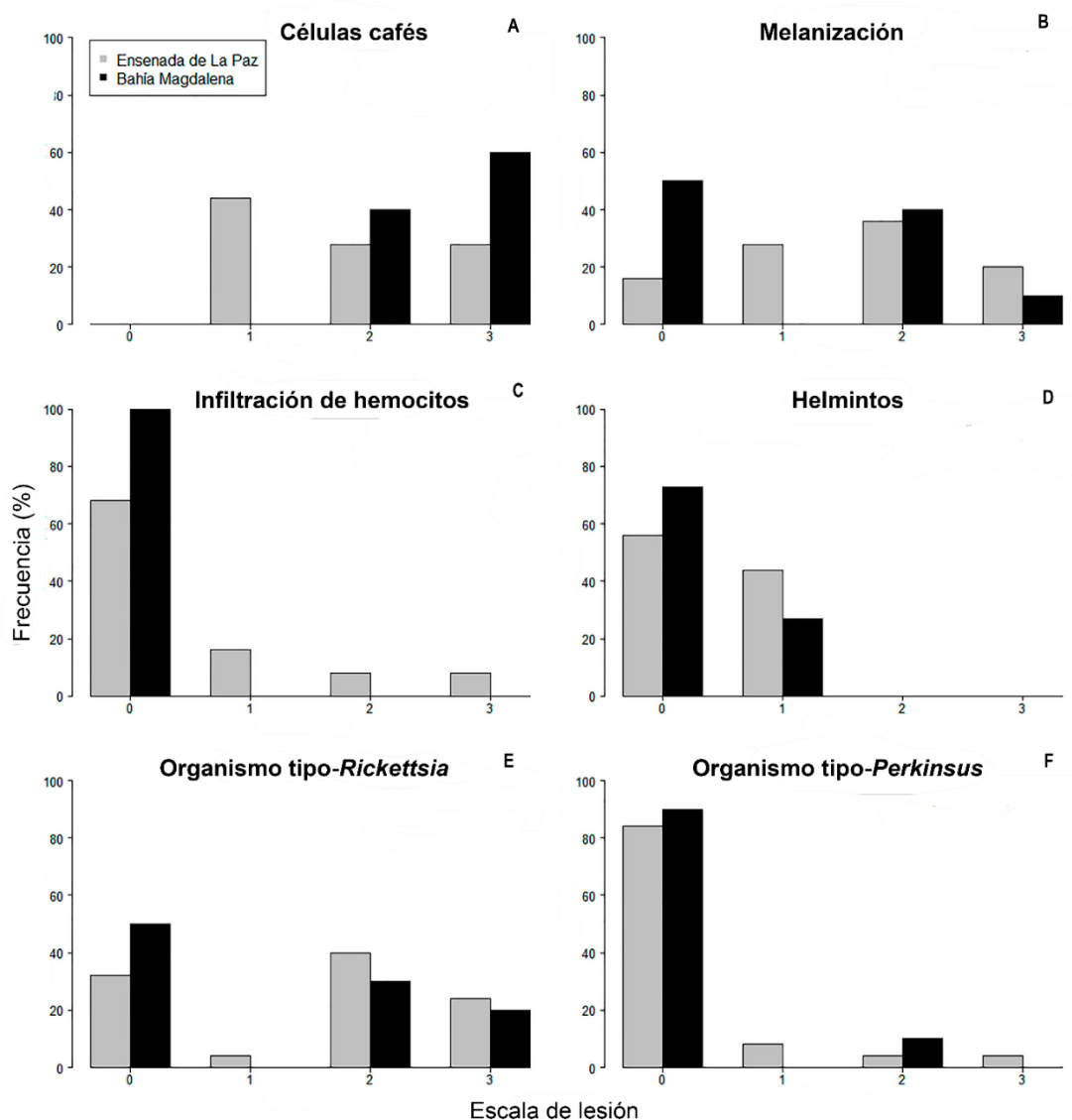


Figura 10. Frecuencia de los niveles de lesiones en reproductores de *Atrina maura* de la Ensenada de La Paz y Bahía Magdalena.

7.1.4 Descripción de las lesiones histopatológicas

La revisión de los tejidos teñidos con Hematoxilina y Eosina reveló una fuerte respuesta inmunitaria ante el estrés ambiental en *A. maura*, evidenciada por la abundante presencia de CC cerca de los parásitos, observándose grandes agrupaciones principalmente en el tejido conectivo del manto (Fig. 11A), el riñón (Fig. 11B) y las gónadas (Fig. 11A, B). Asimismo, se observaron casos de CC fagocitando melanina del manto (Fig. 11D).

Otra estrategia de defensa observada fue la intensa MEL localizada exclusivamente en las células epiteliales del manto, las cuales mostraron una coloración marrón oscura a negra (Fig. 11C, D).

Una respuesta inflamatoria, manifestada como IH, se detectó en menor medida, principalmente en tejidos del manto y gónadas.

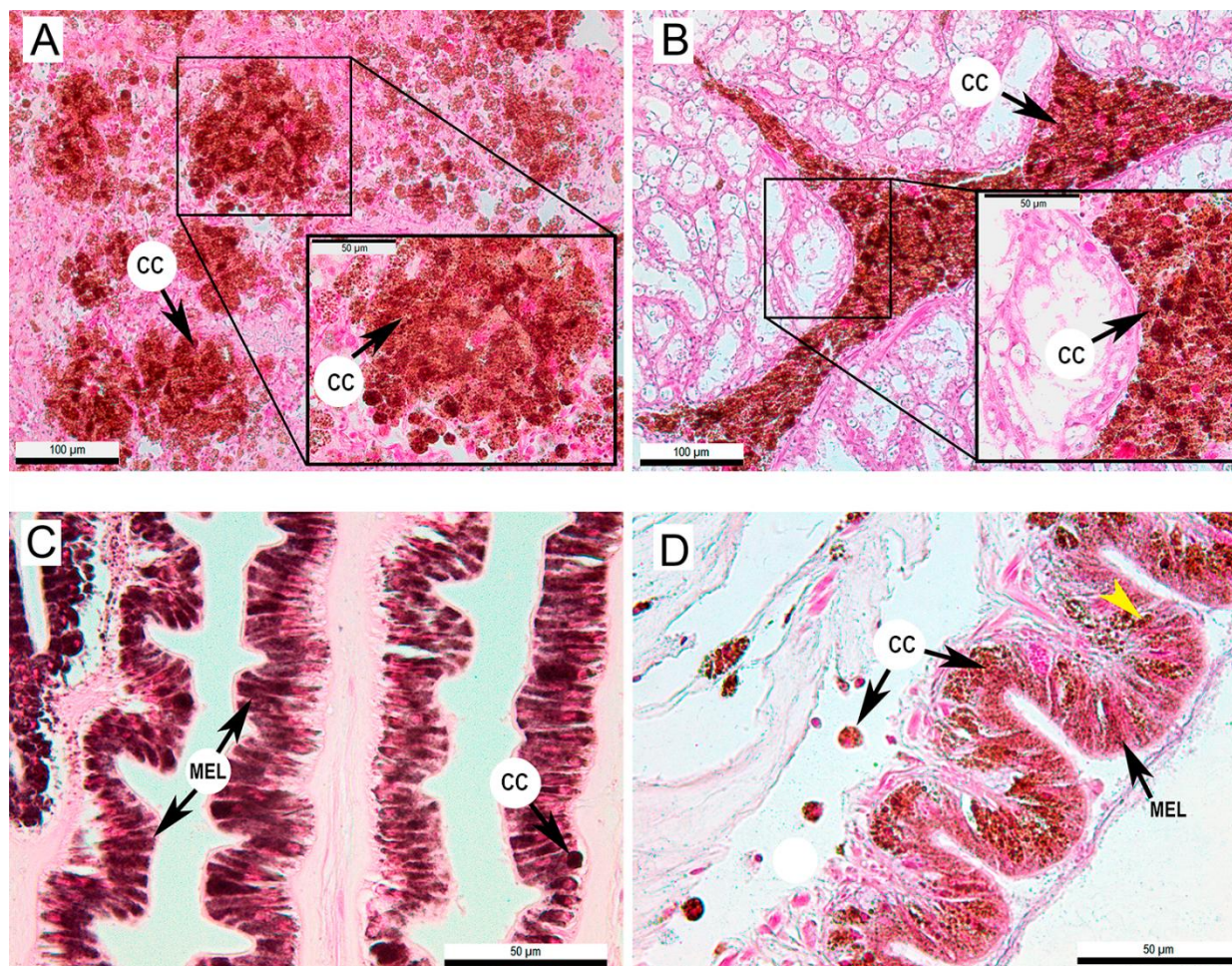


Figura 11. Microfotografías de la respuesta inmunitaria en *Atrina maura*. (A) Células cafés agregadas en el tejido del manto; (B) Células cafés agregadas en el riñón; (C, D) Melanización en el tejido del manto. Secciones de parafina con hematoxilina y eosina (A, B, D) y Fontana-Masson (C); CC = células cafés; MEL = melanización. La flecha amarilla indica células cafés fagocitando la melanina observada en el epitelio del manto.

Se identificó una baja prevalencia de infección por parásitos tipo HEL en el tejido conectivo de las gónadas (Fig. 12A) y del manto (Fig. 12B, C). En la mayoría de los casos, las CC rodeaban a los parásitos, sugiriendo una respuesta inmune activa.

En diferentes partes del epitelio de *A. maura*, principalmente en el manto (Fig. 12D, E), se detectaron grupos de organismos con afinidad eosinofílica (acidófila) compatibles con OTR, los cuales también se observaron en el estómago (Fig. 12F), mostrando variaciones en forma, tamaño y coloración. Se identificaron estructuras compatibles con OTP, aparentemente en una etapa inmadura de desarrollo (Fig. 12G). Esta posible infección por OTP se observó en el manto y riñón, en algunos casos acompañada de una respuesta inflamatoria intensa con fuerte IH (Fig. 12G).

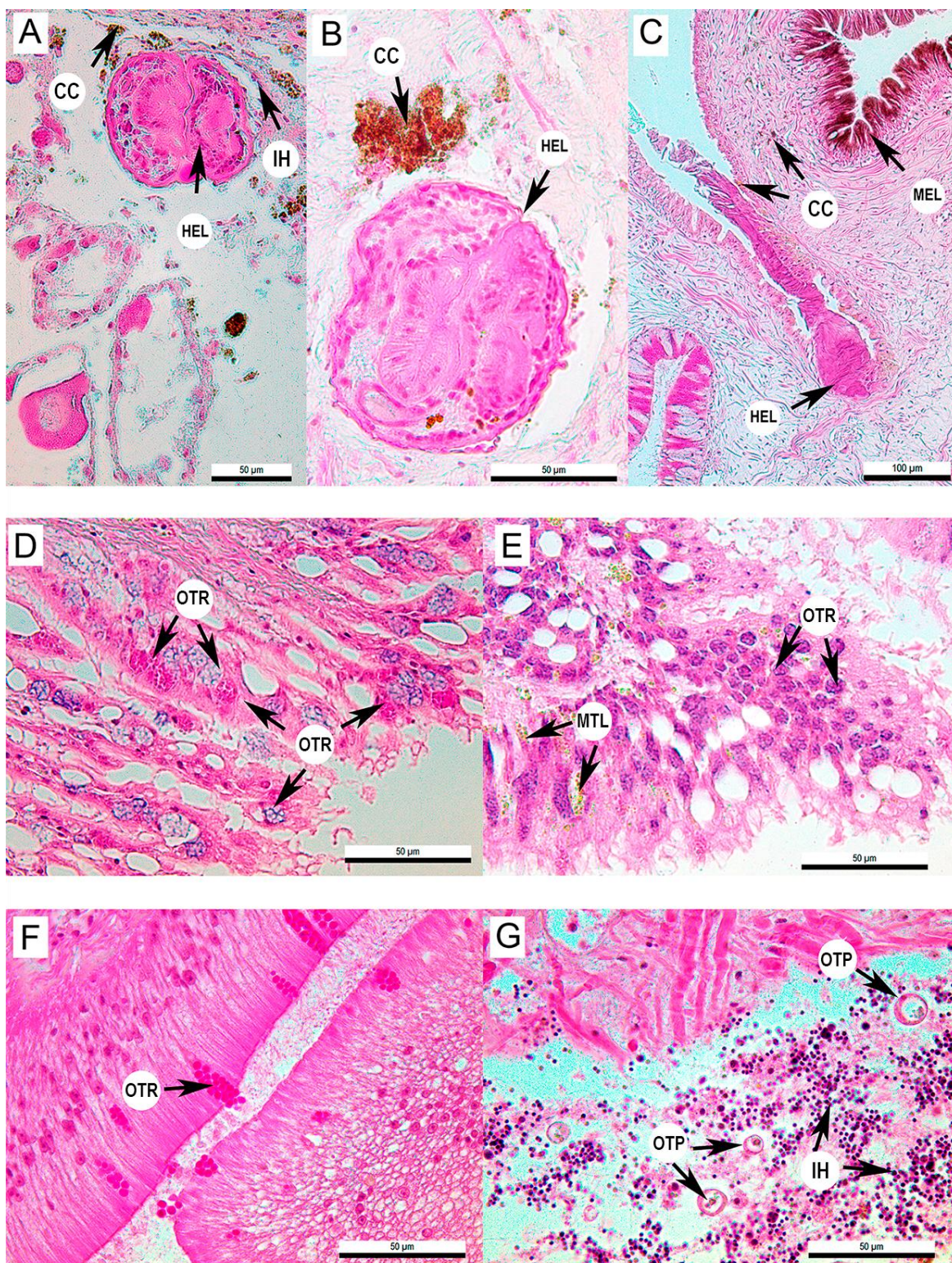


Figura 12. Microfotografías que muestran infecciones parasitarias en *Atrina maura*. (A y B) ilustran un helminto (HEL) dentro de la gónada, (C) muestra un HEL en el manto. (D y E) muestran organismos tipo *Rickettsia* (OTR) en el manto, y (F) muestra OTR en el estómago. (G) muestra organismos similares a *Perkinsus* (OTP).

7.1.5 Degeneración gonadal

El examen microscópico de las gónadas de hembras de *A. maura* reveló una alta prevalencia de ovocitos con deterioro estructural (atresia), principalmente durante las fases de vitelogénesis y postvitelogénesis (Fig. 13). La degeneración ovocitaria se evidenció por la pérdida de la forma esférica, la desintegración del material nuclear y la ruptura de la membrana citoplasmática.

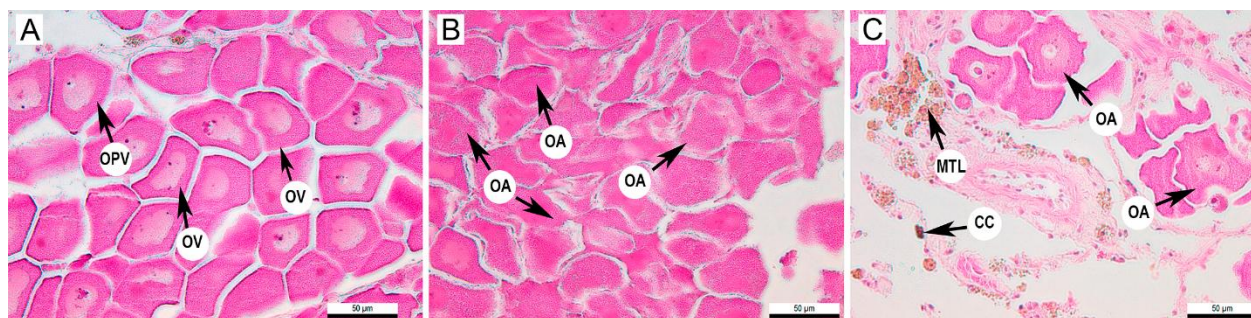


Figura 13. Microfotografías de secciones histológicas de gónadas femeninas de *Atrina maura*. Secciones de parafina, tinción con hematoxilina y eosina; OA = ovocitos atrésicos; CC = células cafés; MTL = material tipo lipofuscinas; OPV = ovocitos postvitellogénicos; OV = ovocitos vitellogénicos.

La presencia de atresia estuvo acompañada por IH y CC, así como por la aparición de material similar a lipofuscina. El porcentaje promedio más alto de ovocitos atrésicos se registró en organismos de ELP (39%), mientras que en BM fue de 35% (Fig. 14).

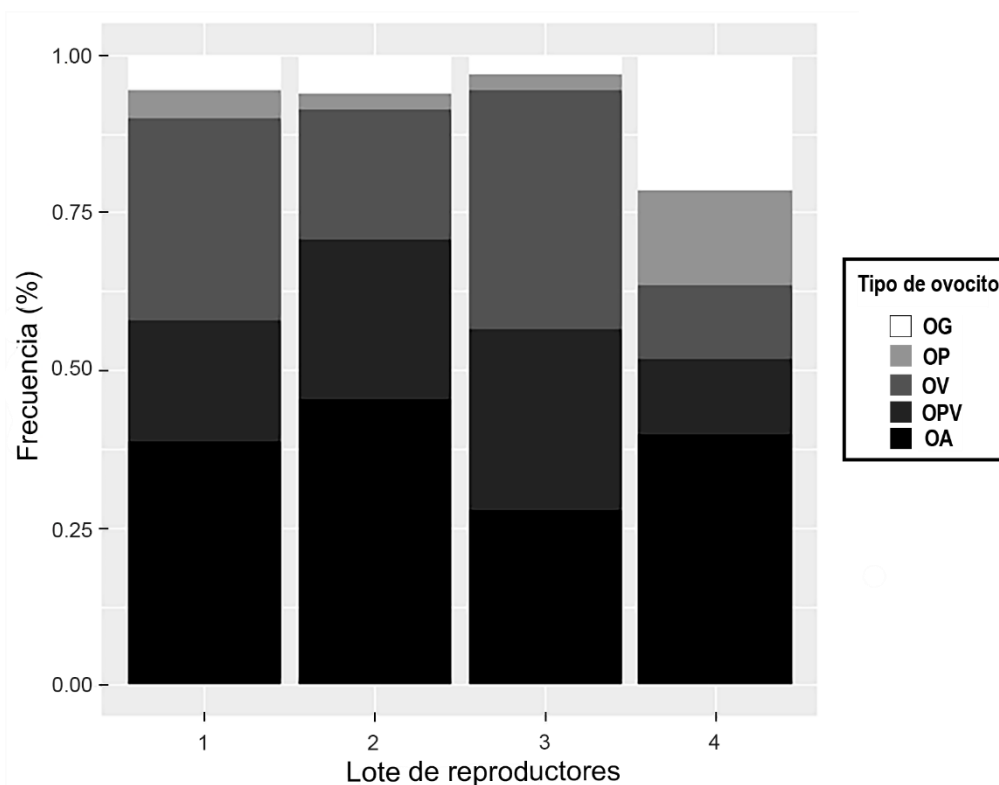


Figura 14. Frecuencias relativas de las distintas etapas de desarrollo de los ovocitos y atresia en organismos de *Atrina maura* de la Ensenada de La Paz (lotes 1 y 2) y Bahía Magdalena (lotes 3 y 4). OG = oogonias; OP = ovocitos previtelogénicos; OV = ovocitos vitelogénicos; OPV = ovocitos postvitelogénicos; OA = ovocitos en atresia.

El porcentaje de folículos degenerados varió entre 9.9% y 62% en ELP, y entre 16.3% y 72.6% en BM, dependiendo de la etapa de desarrollo ovocitario.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas en el número de ovocitos según su etapa de desarrollo en ELP ($H_{4,60} = 40.977$; $P < 0.05$), mientras que en BM no se observaron diferencias significativas ($H_{4,25} = 6.6575$; $P = 0.1551$), a pesar de presentar una mayor proporción de ovocitos en degeneración. El análisis de varianza no mostró diferencias significativas en el grado de atresia entre localidades ($P = 0.401$).

7.2 Dosis microalgal-desarrollo larvario

La altura promedio de la concha (AC) de *A. maura* mostró un incremento sostenido hasta el día 5, seguido de una disminución en el día 7 (Fig. 15A-B). Las dosis media y alta mostraron tallas

similares entre ellas y mayores en comparación con la dosis baja, la cual registró el menor crecimiento. En los días 3 y 7, las tallas promedio de AC fueron de 83.81 y 90.11 μm (dosis baja), 92.07 y 92.72 μm (dosis media), y 91.22 y 93.40 μm (dosis alta), respectivamente. Las tallas promedio de la longitud de la concha (LC) en los días 3 y 7 fueron de 66.80 y 72.18 μm (dosis baja), 69.97 y 75.18 μm (dosis media), y 70.86 y 75.09 μm (dosis alta), respectivamente. Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para AC ($H_{2,2430} = 94.68$, $P < 0.05$) y LC ($H_{2,2430} = 81.92$, $P < 0.05$). La dosis baja fue significativamente diferente de las dosis media y alta ($P < 0.05$), mientras que no se encontraron diferencias significativas entre estas últimas ($P = 0.627$).

Se observó una alta mortalidad larval en todos los tratamientos a lo largo del experimento (Fig. 15C). Las densidades iniciales de 5 larvas/ mL^{-1} (100%) descendieron hasta valores mínimos de 0.04 larvas/ mL^{-1} (0.8%) en el día 7. La dosis media presentó ligeramente mayores valores de supervivencia, con un máximo de 4.88 larvas/ mL^{-1} (día 3) y un promedio general de 0.99 larvas/ mL^{-1} , a diferencia del 0.81 y 0.76 larvas/ mL^{-1} para las dosis alta y baja, respectivamente. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($H_{2,81} = 0.341$; $P = 0.843$).

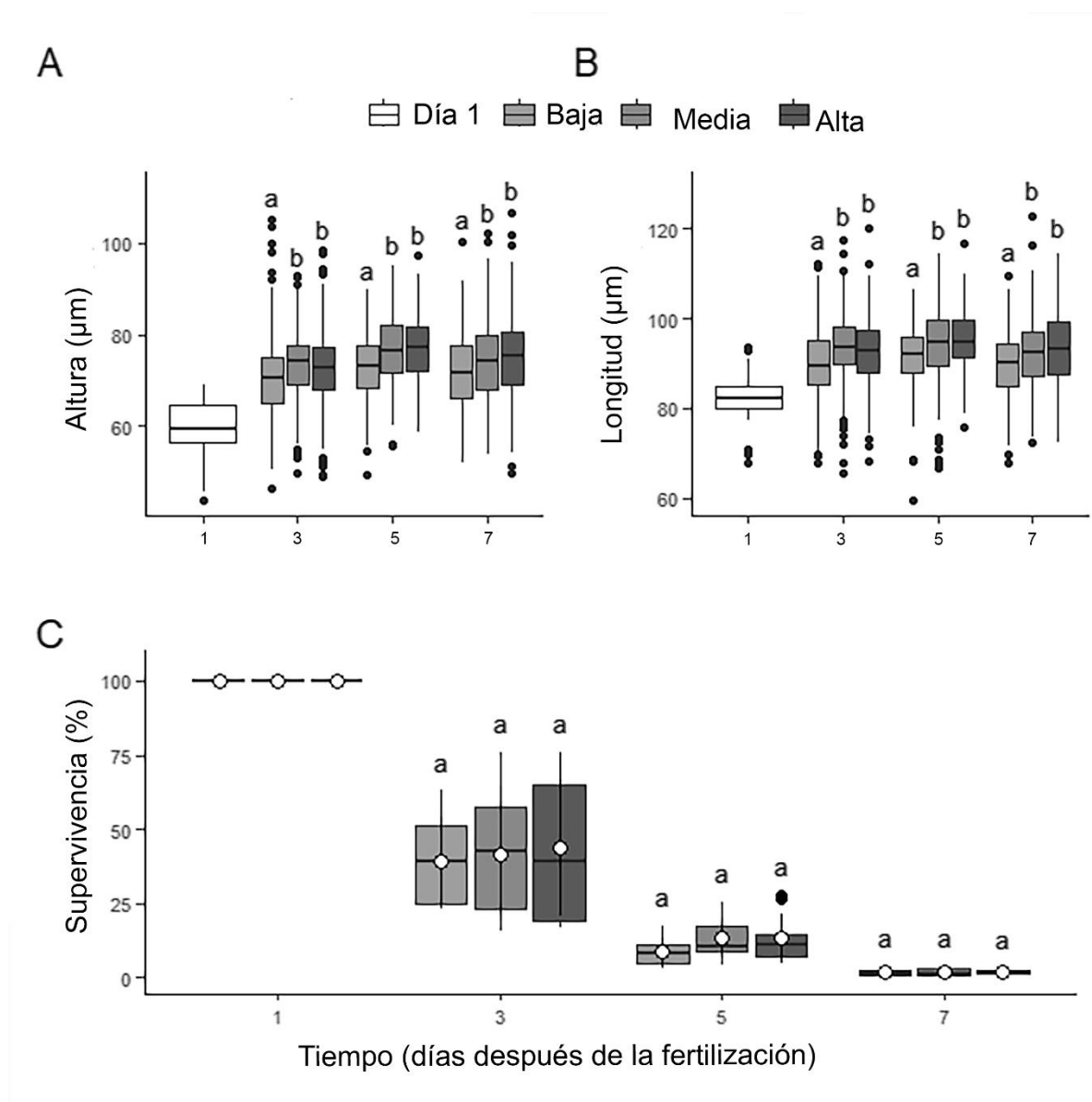


Figura 15. Efecto de la dosis de microalgal en larvas de *Atrina maura* durante el cultivo larvario. Mediana, percentiles 25 y 75 %, mínimo, máximo y valores atípicos (puntos negros) de A) altura promedio de la concha (μm), B) largo promedio de la concha (μm) y C) tasas de supervivencia (%). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos por día

El análisis del alimento residual mostró una baja ingestión por parte de las larvas de *A. maura*, con porcentajes superiores al 90% en todos los tratamientos (Fig. 16A). Los valores promedio fueron de $4,722.2 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ (94.4 %) para la dosis baja, $9,444.4 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ (94.4 %) para la dosis media y $18,194.4 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ (91 %) para la dosis alta, observándose incluso excedentes en algunos casos. Por otro lado, el tamaño celular de *I. galbana* (Fig. 16B), se registró un promedio de $4.8 \mu\text{m}$, con

la mayoría de las células entre 4 y 5.5 μm , mientras que solo el 7.5% presentó un tamaño inferior a 4 μm .

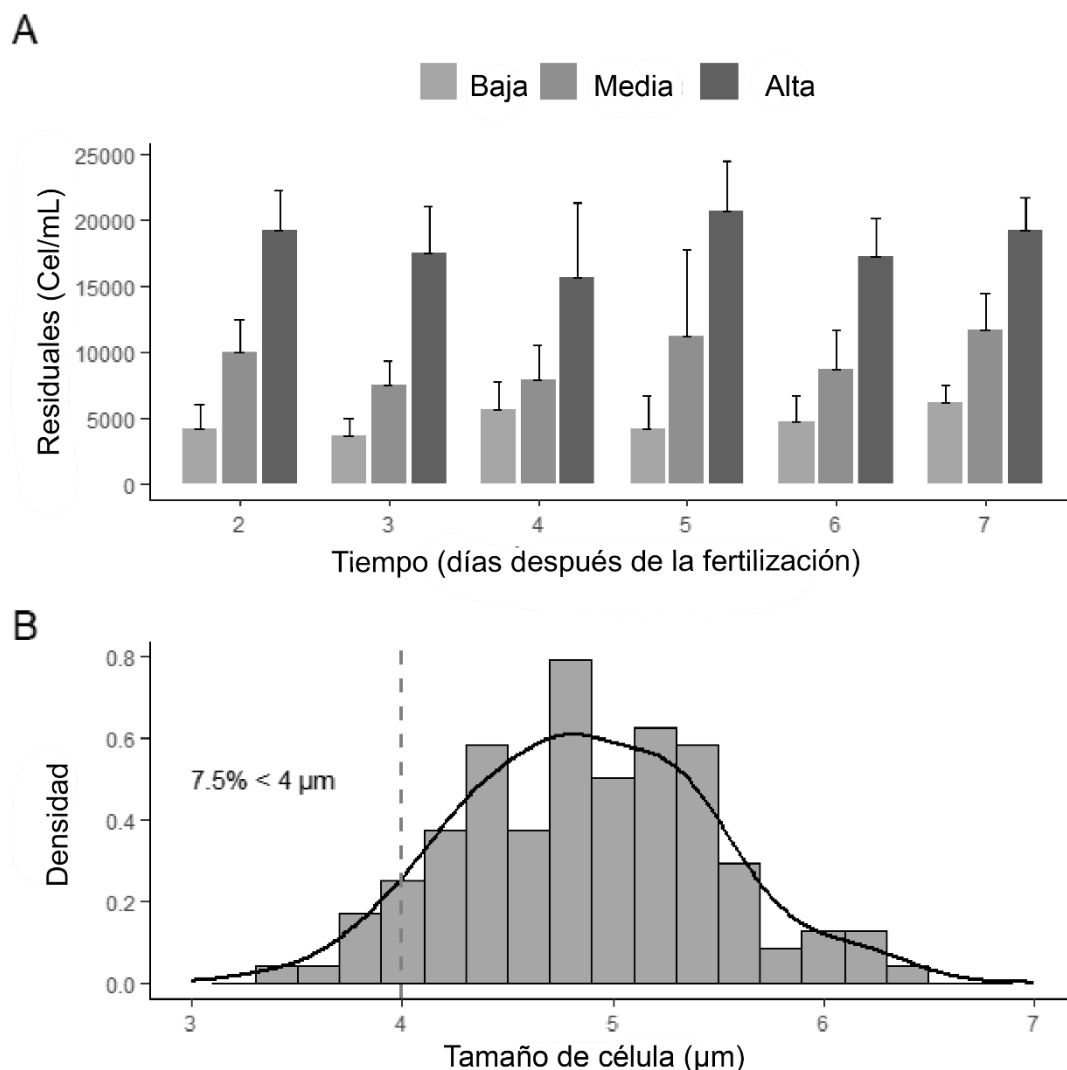


Figura 16. A) Valor promedio de la microalga residual (cel/mL^{-1}) en cada tratamiento, expresado como porcentaje del alimento suministrado (*Isochrysis galbana*) durante el cultivo larvario de *Atrina maura*. Las barras verticales de error denotan la desviación estándar. B) Distribución del tamaño celular de *I. galbana*. La línea vertical punteada denota el tamaño celular hipotético adecuado de las microalgas que ingieren las larvas de *A. maura*.

7.3 Dieta monoalgal–desarrollo larvario

El análisis general del crecimiento larvario durante el comparativo de las microalgas *I. galbana* y *P. lutheri* mostró diferencias significativas en la AC ($H_{1,1260} = 8.51$; $P < 0.05$) (Fig. 17A) y LC (Fig. 17B) ($H_{1, 1260} = 4.53$; $P < 0.05$), dando mejores resultados la especie *P. lutheri*.

En el tratamiento con *I. galbana*, la AC promedio varió entre 79.2 y 102 μm en los días 3 y 15, respectivamente. La LC presentó un promedio de 64.44 y 99.05 μm en los mismos días. La microalga *P. lutheri* dio lugar a tallas promedio de 80.0 y 103.45 μm en la AC en los días 3 y 15, respectivamente. La LC promedio osciló entre 66.50 y 101.47 μm en los días 3 y 15.

La supervivencia promedio (Fig. 17C) no mostró diferencias significativas entre tratamientos ($H_{1,20} = 0.207$; $P = 0.6488$), aunque pareciera haber una tendencia a mayores valores en el grupo alimentado con *P. lutheri* a lo largo del bioensayo, especialmente en el día 5, donde se registraron valores de 89.5 % con *P. lutheri* y 71 % con *I. galbana*.

El tamaño celular promedio de las microalgas (Fig. 17D) presentó variaciones durante el experimento. A pesar de esto, se detectaron diferencias significativas entre especies ($H_{560} = 63.389$; $P < 0.05$), siendo *P. lutheri* ($\bar{X}=3.9 \mu\text{m}$) significativamente más pequeña que *I. galbana* ($\bar{X}=4.5 \mu\text{m}$).

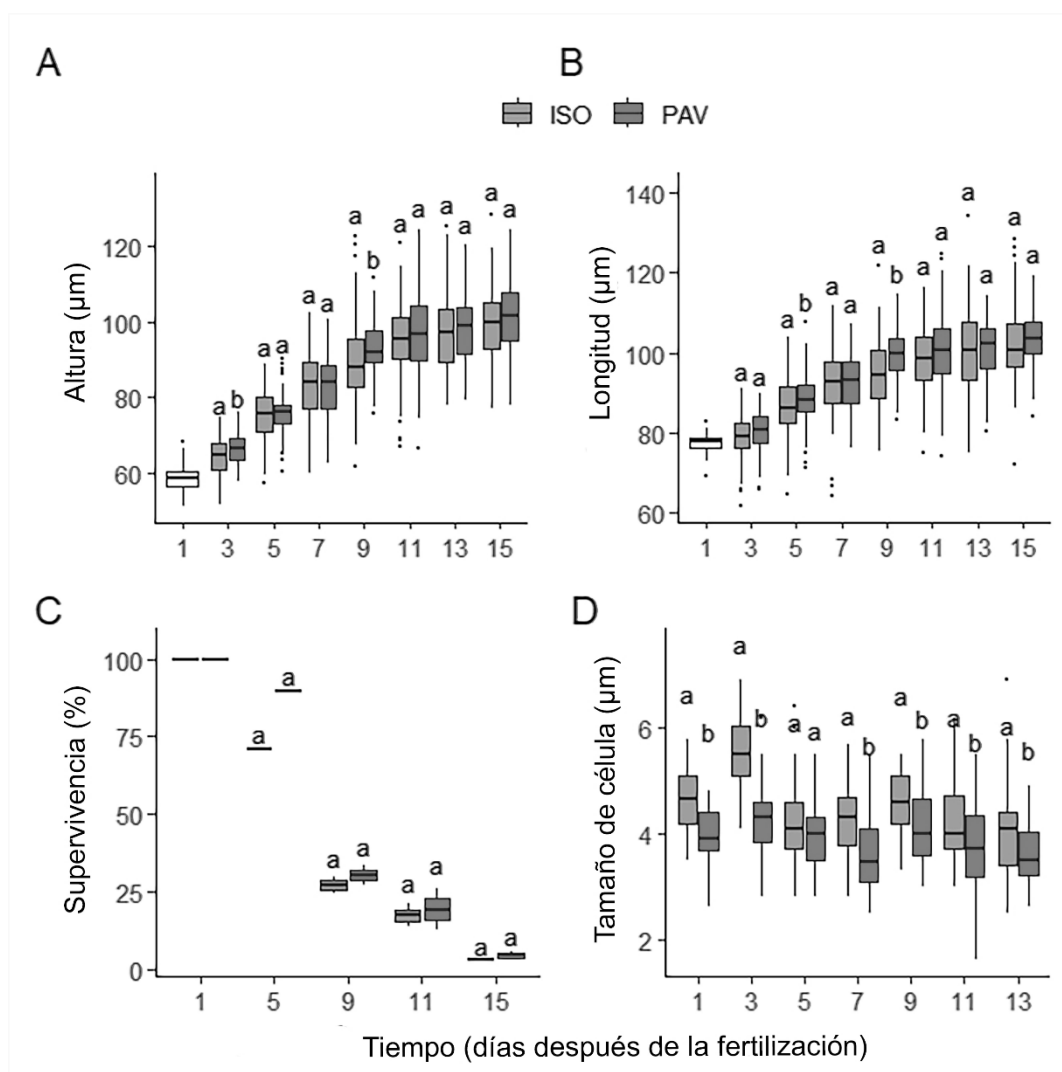


Figura 17. Crecimiento larvario de *Atrina maura* alimentadas con dos dietas diferentes a base de las microalgas: *Isochrysis galbana* (ISO) y *Pavlova lutheri* (PAV). Mediana, percentiles 25 y 75 %, mínimo, máximo y valores atípicos de A) altura de la concha (µm), B) longitud de la concha (µm), C) tasas de supervivencia larvaria (%) y D) tamaño celular de cada microalga (µm) durante el periodo de cultivo. Las letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos por día de valuación ($P < 0.05$).

7.4 Índice de ingestión

El índice de ingestión indica que las larvas de *A. maura* ingieren de manera más eficiente las microalgas de menor tamaño, mientras que la capacidad de ingestión se reduce a medida que el tamaño de la partícula se incrementa (Tabla 4), principalmente durante los primeros días. En este sentido, la microalga *P. lutheri* resultó ser la especie con mayor índice de ingestión (65.23%-87.16%), mientras que *C. muelleri* fue la menos ingerida (12.45%).

Tabla 4. Índice de ingestión de larvas veliger-umbonadas de *Atrina maura* en relación con el tamaño celular de las microalgas. Altura promedio larvaria (APL), Ingestión larvaria (IL), Tiempo de alimentación (TA).

Especie microalga	Código	Tamaño de célula (μm)				Edad (días)	APL (μm)	IL (%)	TA (minutos)
		Mínimo	Máximo	Media	Mediana				
<i>Isochrysis galbana</i>	ISO	2.34	5.98	3.93	4.14	2	58.52	40.58	240
		2.76	5.06	3.76	3.71	9	87.16	83.02	60
		1.84	3.63	3.63	3.68	2	61.27	73.53	60
		2.76	5.08	3.95	3.79	11	107.91	61.48	60
		2.30	4.60	3.64	3.68	1	60.52	0.00	60
		2.76	5.99	3.90	3.68	2	63.51	33.85	60
<i>Isochrysis galbana*</i>	ISO F	1.38	5.20	3.01	2.78	2	61.27	89.15	60
		1.03	5.80	3.04	2.97	11	107.91	74.175	60
		-	-	-	-	1	60.52	0	60
		-	-	-	-	2	63.51	42.62	60
<i>Pavlova lutheri</i>	PAV	1.84	5.14	3.44	3.46	2	58.52	77.55	240
		2.30	5.08	3.55	3.68	9	87.16	87.16	60
		1.66	5.38	3.83	3.94	15	113.92	81.85	60
		2.76	4.62	3.59	3.46	1	60.52	0.00	60
		1.90	4.69	3.63	3.68	2	63.51	65.23	60

<i>Pavlova lutheri</i>	PAV F	-	-	-		1	60.5226	0	60
		-	-	-		2	63.5061	0	60
<i>Chaetoceros</i>									
<i>calcitrans</i>	CAL	3.22	7.81	5.0	4.65	9	87.16	52.37	60
		3.22	6.63	4.9	4.92	15	113.92	77	60
<i>Chaetoceros</i>									
<i>muelleri</i>	MUE	3.68	10.21	6.06	6.02	11	107.91	12.45	60
		3.93	8.55	6.26	5.94	1	60.52	0	60
		4.24	8.78	6.22	6.32	2	63.51	0	60
<i>Chaetoceros</i>									
<i>muelleri</i>	MUE F	1.45	7.81	3.18	2.48	11	107.91	41.61	60
		-	-	-		1	60.5226	0	60
		-	-	-		2	63.5061	0	60

Nota: los colores sombreados indican comparaciones simultáneas de cultivos larvarios. La letra (F) indica microalgas fragmentadas.

Durante el primer día de cultivo, no se registró ingesta de ninguna de las microalgas utilizadas, tanto en su forma íntegra, como en su forma fragmentada. Durante el día dos, una media de 49.32 % ingirieron *I. galbana* (Fig. 18A), mientras que con *P. lutheri* fue de 71.39 % (Fig. 18B). El uso de microalgas bajo un proceso de fragmentación incrementó el porcentaje de ingesta. En el día 11, la microalga de mayor tamaño utilizada, *C. muelleri* fue ingerida en un 12.45% (Fig. 18C) en su forma íntegra y en un 41.61% (Fig. 18D) fragmentada. Durante el día 15, las larvas umbadas incrementan su capacidad de ingerir alimento de mayor tamaño. En este sentido, el porcentaje de ingestión fue similar con la microalga *C. calcitrans* (77%, Fig. 18E) y con *P. lutheri* (81.85, Fig. 18F). Sin embargo, se puede observar una fluorescencia más intensa con *P. lutheri* con respecto a *I. galbana*.

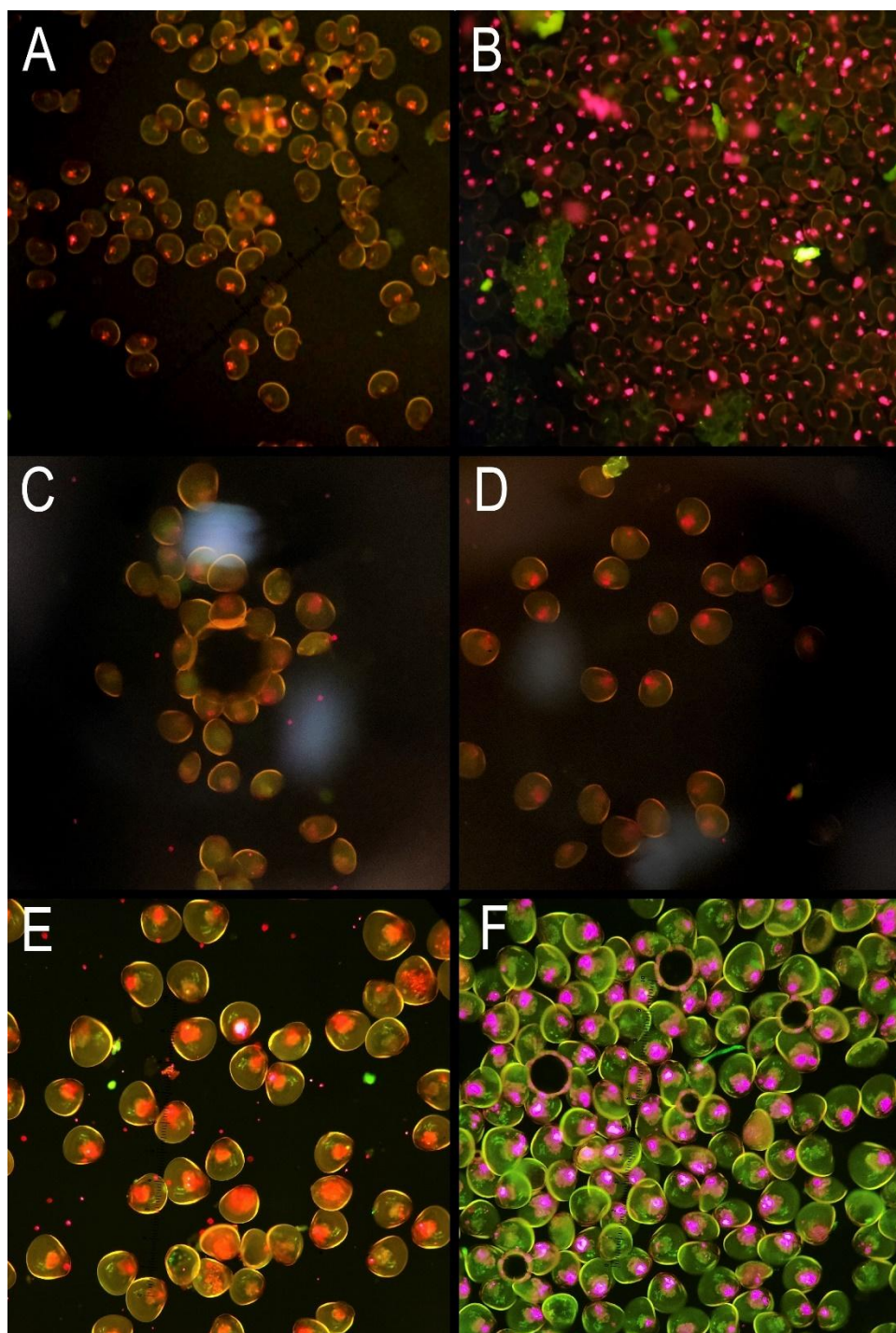


Figura 18. Ingestión de microalgas en larvas de *Atrina maura* (10×). Larvas veliger de dos días alimentadas con (A) *Isochrysis galbana* y (B) *Pavlova lutheri*. Larvas umbonadas tempranas (11 días) alimentadas con (C) *Chaetoceros muelleri* y (D) *C. muelleri* fragmentada. Larvas umbonadas (15 días) alimentadas con (E) *Chaetoceros calcitrans* y (F) *Pavlova lutheri*.

El MAG explicó el 57% de la variabilidad en la ingestión larvaria. Los términos suavizados mostraron efectos no lineales significativos para *I. galbana* fragmentada, *C. muelleri* y la AC de las larvas ($P < 0.05$, Tabla 5). En contraste, *C. calcitrans*, *I. galbana*, *C. muelleri* fragmentada y *P. lutheri* no presentaron efectos significativos en el índice de ingesta. De manera general, el porcentaje de ingesta se vio relacionado fuertemente con el tamaño de la microalga (Fig. 19A) y la AC (Fig. 19B).

Tabla 5. Grados efectivos de libertad (gle) y valores p para los términos suavizados del Modelo Aditivo Generalizado (GAM) de la ingestión larval de *Atrina maura*, categorizado por la especie de microalga, el tamaño de partícula y la altura promedio de la concha larval.

Variables independientes	Código	gle	Valor de P
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	CAL	1.000	0.49164
<i>Isochrysis galbana</i>	ISO	1.000	0.89201
<i>Isochrysis galbana</i>	ISO F	3.875	0.00353
<i>Chaetoceros muelleri</i>	MUE	2.939	1.72 e-06
<i>Chaetoceros muelleri</i>	MUE F	1.26	0.53535
<i>Pavlova lutheri</i>	PAV	2.579	0.19131
Altura de la concha	AC	2.801	1.92 e-07

(F) Indica un proceso de fragmentación. gle= grados de libertad efectivos. Valores de P en negrita indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

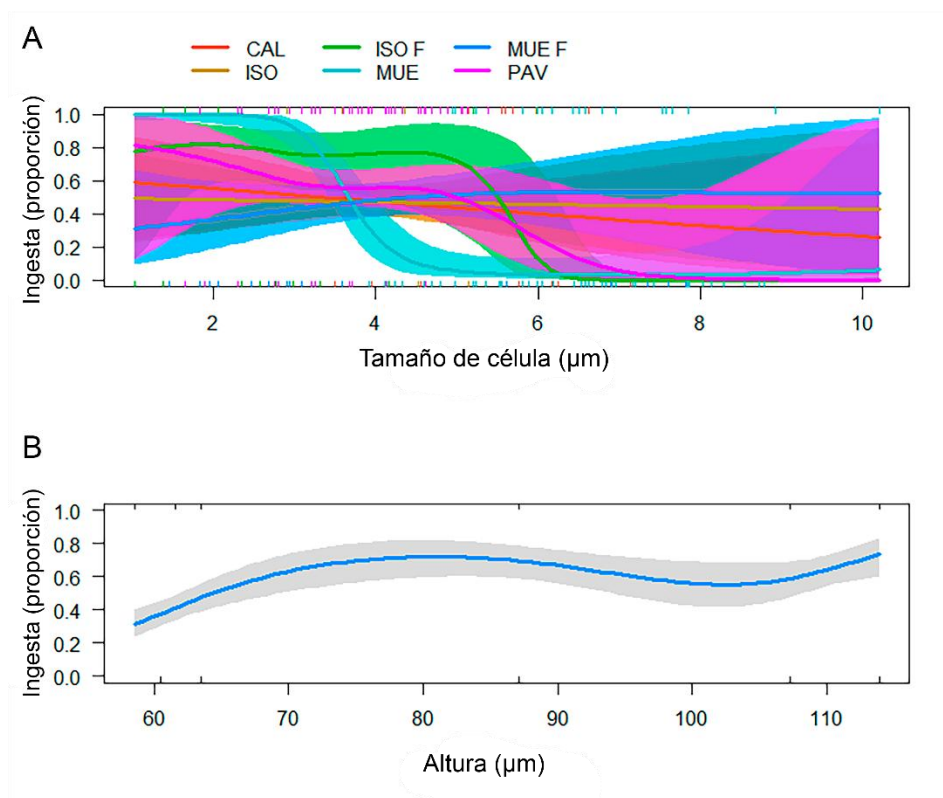


Figura 19. Figuras de efectos parciales del Modelo Aditivo Generalizado (MAG) de la proporción de larvas de *Atrina maua* que ingirieron especies de microalgas (imagen superior) en relación con la altura de la concha de las larvas (imagen inferior). Las áreas sombreadas indican intervalos de confianza del 95 % en torno a las funciones suavizadas ajustadas.

7.5 Fotoperiodo-desarrollo larvario

Las tallas larvales mostraron variaciones significativas según el fotoperiodo aplicado. En el tratamiento de luz continua (24:0), la AC osciló entre 65.69 y 128.42 μm , con un promedio de 83.36 μm en el día 3, aumentando hasta 104.85 μm en el día 13. Para el fotoperiodo 12:12, la AC varió entre 62.38 y 113.62 μm , con promedios de 84.37 μm y 99.53 μm en los días 3 y 13, respectivamente (Fig. 20A).

En cuanto a la LC, el tratamiento 24:0 presentó un rango de 57.19 a 126.29 μm , con promedios de 67.41 μm en el día 3 y 104.86 μm en el día 13. Para el fotoperiodo 12:12, la LC osciló entre 59.11 y 133.86 μm , con tallas promedio de 67.43 μm y 98.59 μm en los días 3 y 13, respectivamente (Fig. 20B).

En el análisis general, se encontraron diferencias significativas entre tratamientos tanto para la AC ($H_{1,1080} = 7.97$; $P < 0.05$) como para LC ($H_{1,1080} = 6.27$; $P < 0.05$), siendo la luz continua (24:0) la condición que favoreció un mayor crecimiento larvario. A pesar de que la supervivencia fue mayor en el tratamiento 24:0 durante todas las evaluaciones, no se encontraron diferencias significativas (Fig. 20 C) entre los diferentes regímenes de luz analizados ($H_{1,24} = 1.1585$; $P = 0.2818$).

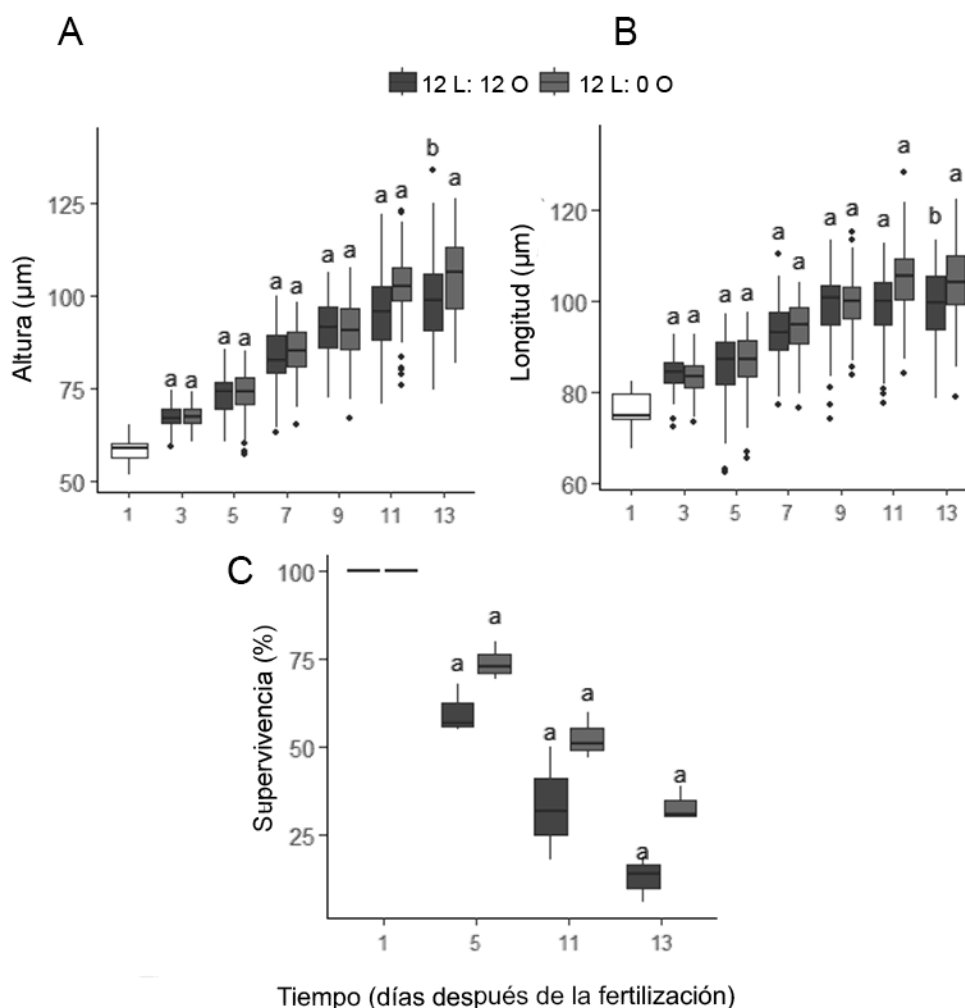


Figura 20. Efecto del fotoperiodo en el crecimiento y supervivencia larvaria de *Atrina maura*. Mediana, percentiles 25 y 75 %, mínimo, máximo y valores atípicos de A) altura de la concha (μm), B) longitud de la concha (μm) y C) tasas de supervivencia larvaria. Las letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos por día de valuación ($P < 0.05$).

7.6 Bioensayos *in vitro*

7.6.1 Aislamiento y purificación de cepas bacterianas

Se aislaron y purificaron un total de 28 cepas bacterianas, de los cuales 12 se obtuvieron del tejido de gónada, 10 de glándula digestiva, 2 de branquia, 3 de sedimento y 1 de la microalga *I. galbana*.

7.6.2 Caracterización inicial de las cepas seleccionadas

La prueba de tinción de Gram aplicada a las cepas purificadas mostró que el 89 % (25) correspondió a bacterias Gram negativas, mientras que el 11 % (3) fueron Gram positivas. Posteriormente, las pruebas para la detección de *Vibrio spp.* realizadas sobre las cepas Gram negativas resultaron positivas en un 72 % (18 cepas).

La prueba de hemólisis mostró que el 42.9 presentó una hemólisis tipo Alpha (α), el 10.71 % un crecimiento con hemólisis completa tipo Beta (β), el 35.71 % exhibió hemólisis gama (γ , Gram positivas) y el 10.7 % no presentó hemólisis (sin crecimiento). La prueba de antagonismo fue negativa en el 100 % de los casos (Fig. 21).

Finalmente, se seleccionaron dos cepas bacterianas (Tabla 6), la cepa C26 registró un crecimiento máximo de 1.8×10^9 UFC·mL⁻¹ en 24 horas, considerablemente menor al observado en la cepa C29, que alcanzó 3.7×10^9 UFC·mL⁻¹.

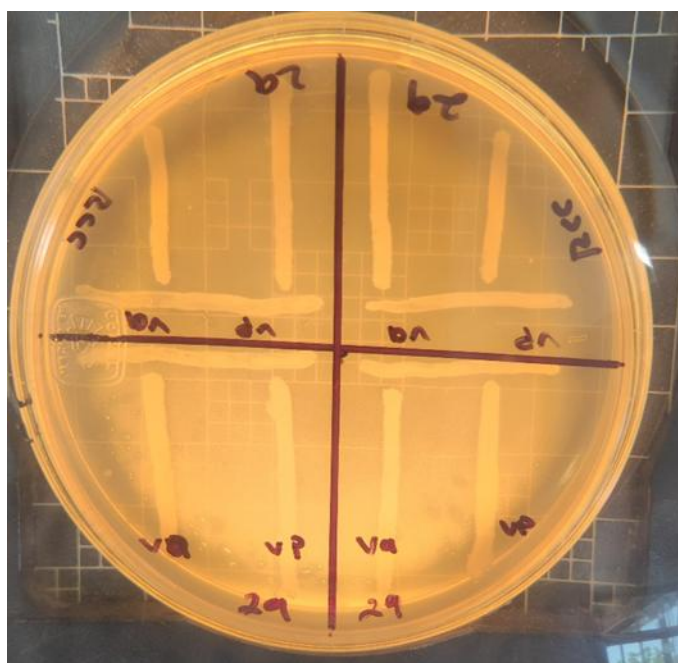


Figura 21. Prueba de antagonismo por el método de estría cruzada. Las líneas verticales corresponden a las cepas patógenas: *Vibrio alginolyticus* (va), *Vibrio parahaemolyticus* (vp). Las líneas horizontales en el centro de la caja corresponden a la cepa en prueba, en este caso C29.

Tabla 6. Caracterización fenotípica y funcional de las cepas bacterianas seleccionadas, incluyendo tinción de Gram, morfología, crecimiento en TCBS, actividad hemolítica, antagonismo, UFC y origen.

Cepa	Origen	Tinción de Gram	Forma	TCBS	Actividad hemolítica	Antagonismo	UFC·mL ⁻¹
C26	Sedimento	Gram (+)	Pediococcus	(-)	γ	Negativo	1.8 X 10 ⁹
C29	<i>I. galbana</i>	Gram (+)	Cocos	(-)	γ	Negativo	3.7 X 10 ⁹

7.6.3 Interacción microalga-bacteria

La interacción entre las microalgas y las cepas bacterianas evaluadas mostró efectos diferenciados para cada combinación. En *I. galbana*, la adición de ambas bacterias promovió un crecimiento significativamente mayor con respecto al control durante el día 2 del bioensayo ($P < 0.05$). La cepa C26 mantuvo una tendencia de mayor beneficio a lo largo del experimento; sin embargo, en los muestreos posteriores no se detectaron diferencias significativas (Fig. 22).

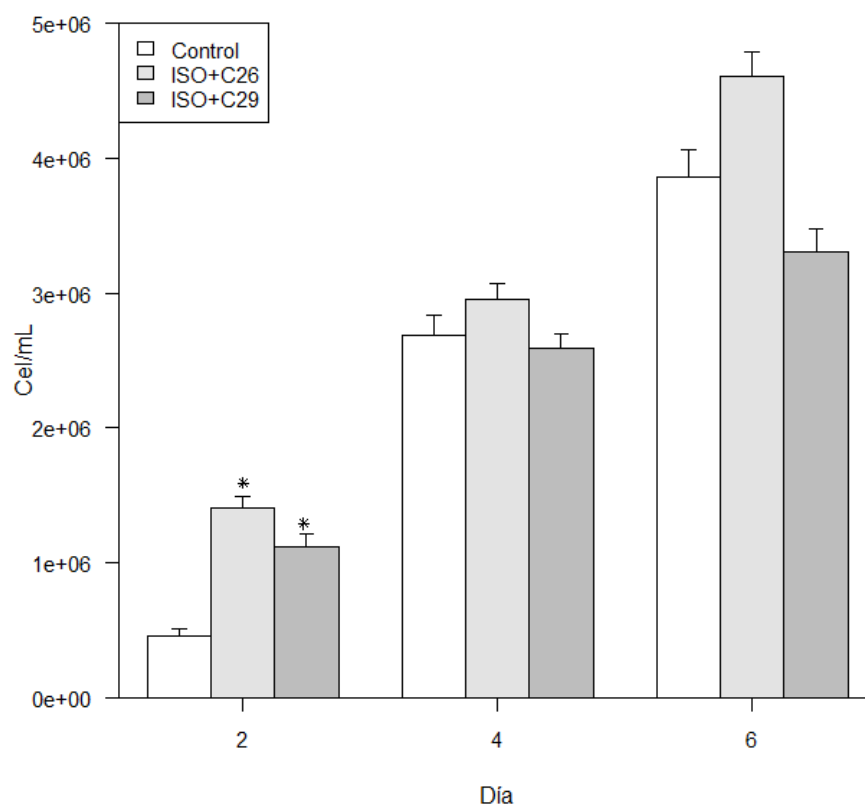


Figura 22. Evaluación del crecimiento microalgal en el co-cultivo in vitro de la microalga *Isochrysis galbana* con las cepas bacterianas C26 y C29. Las barras de error denotan la desviación estándar y los asteriscos diferencias significativas entre tratamientos por día.

En contraste, el crecimiento de *C. calcitrans* disminuyó de manera significativa ($P < 0.05$) únicamente en su interacción con la cepa C26 durante el primer día de evaluación (Fig. 23). Aunque la cepa C29 mostró una tendencia a promover un mayor crecimiento de esta microalga, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

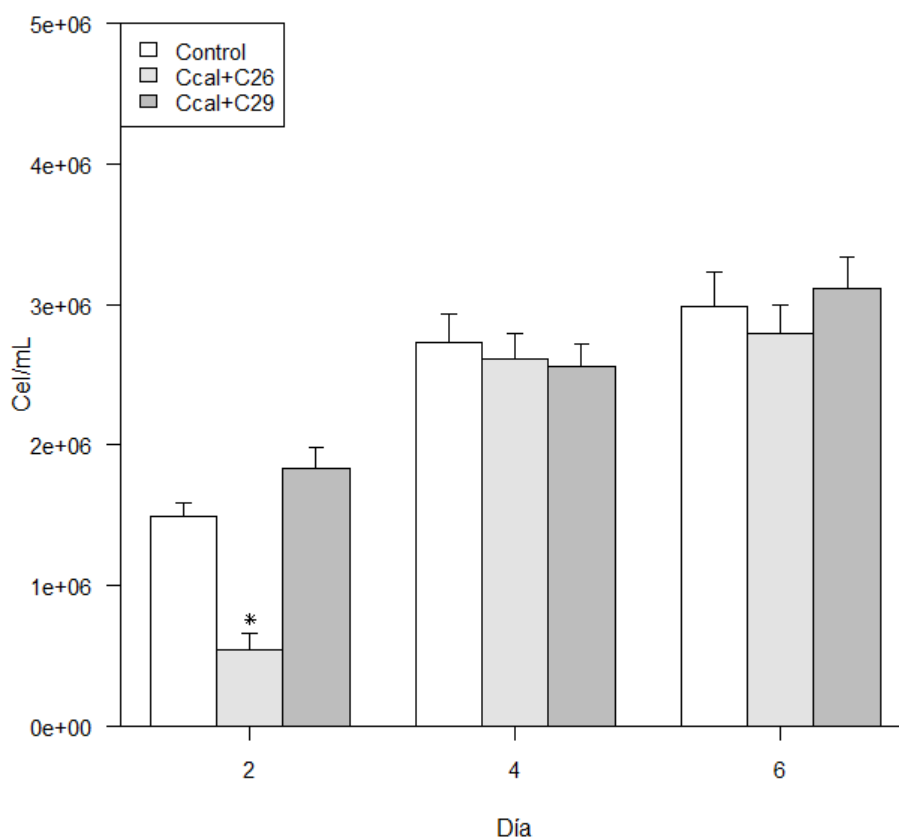


Figura 23. Evaluación del crecimiento microalgal en el co-cultivo in vitro de la microalga *Chaetoceros calcitrans* con las cepas bacterianas C26 y C29. Las barras de error denotan la desviación estándar y los asteriscos diferencias significativas entre tratamientos por día.

En cuanto al crecimiento bacteriano, la concentración de $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ de la cepa C29 en co-cultivo con ambas microalgas presentó una disminución progresiva lo largo del bioensayo, aunque se mantuvo siempre por encima del inóculo inicial ($1 \times 10^6 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$). La cepa C26 mostró un patrón similar, aunque con un crecimiento más limitado, particularmente en su interacción con *C. calcitrans*, donde al final del bioensayo presentó valores inferiores al inóculo inicial (Fig. 24).

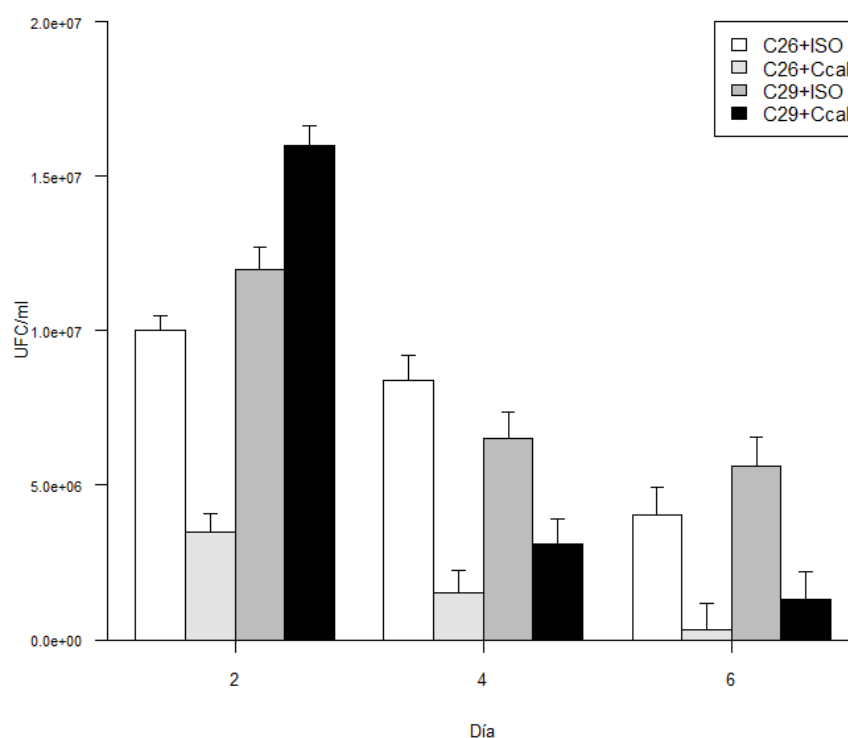


Figura 24. Evaluación de la concentración de UFC mL⁻¹ en co-cultivo con las microalgas *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros calcitrans*. Las barras de error denotan la desviación estándar y los asteriscos diferencias significativas entre tratamientos por día.

Los cultivos control en TSB (Fig. 25) y en medio Guillard F/2 (Fig. 26) mostraron comportamientos contrastantes. Mientras que en TSB el crecimiento bacteriano fue muy superior al observado en cualquier interacción con microalgas, en el medio F/2 ambas cepas fueron incapaces de prosperar en ausencia de microalgas.

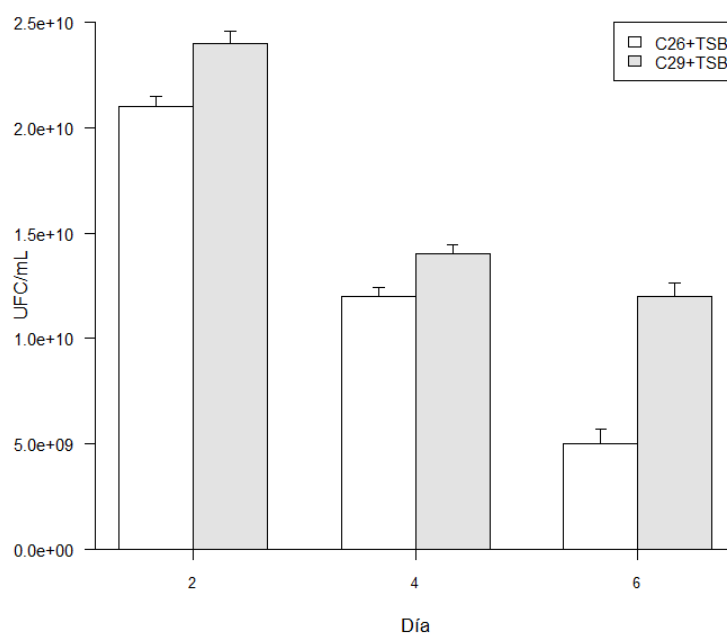


Figura 25. Concentración de las UFC mL⁻¹ de las cepas C26 y C29 inoculadas en medio de cultivo TSB. Las barras de error denotan la desviación estándar.

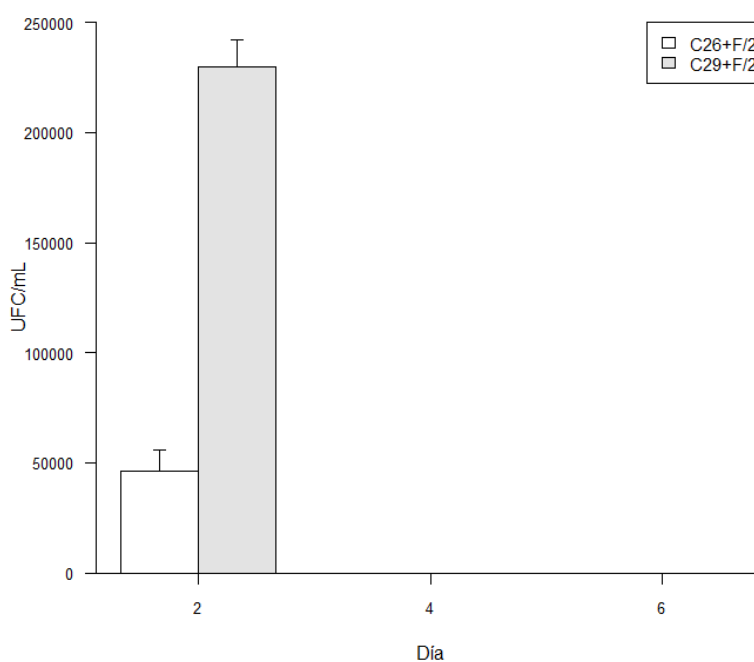


Figura 26. Concentración de las UFC mL⁻¹ de las cepas C26 y C29 inoculadas en medio de cultivo de Guillard F/2. Las barras de error denotan la desviación estándar.

7.7 Bioensayos *in vivo*

7.7.1 Efecto de la cepa C29 en el desarrollo larvario de *A. maura*

El bioensayo *in vivo* con larvas de *A. maura* y la cepa C29 mostró diferencias significativas en el crecimiento de la AC ($H_{1,720} = 19.102$; $P < 0.05$) (fig. 27A) y el LC ($H_{1,720} = 6.9079$; $P < 0.05$) (Fig. 27B), siendo superior en aquellas unidades experimentales adicionadas con la suspensión bacteriana. Por otro lado, el crecimiento de AC y LC no mostró diferencias significativas en el análisis por día de evaluación, a excepción de la AC en el día 5, en donde el grupo control mostró un crecimiento superior ($H_{1,180} = 10.639$; $P < 0.05$). Durante el cultivo larvario se observó una mortalidad significativa en el grupo control, principalmente en larvas de tallas menores, lo que llevó a desechar una réplica en el séptimo día de evaluación. Con base en estos resultados, la supervivencia mostró diferencias significativas en el análisis general ($H_{1,12} = 8.3368$; $P < 0.05$) (fig. 27C) y en el análisis por día.

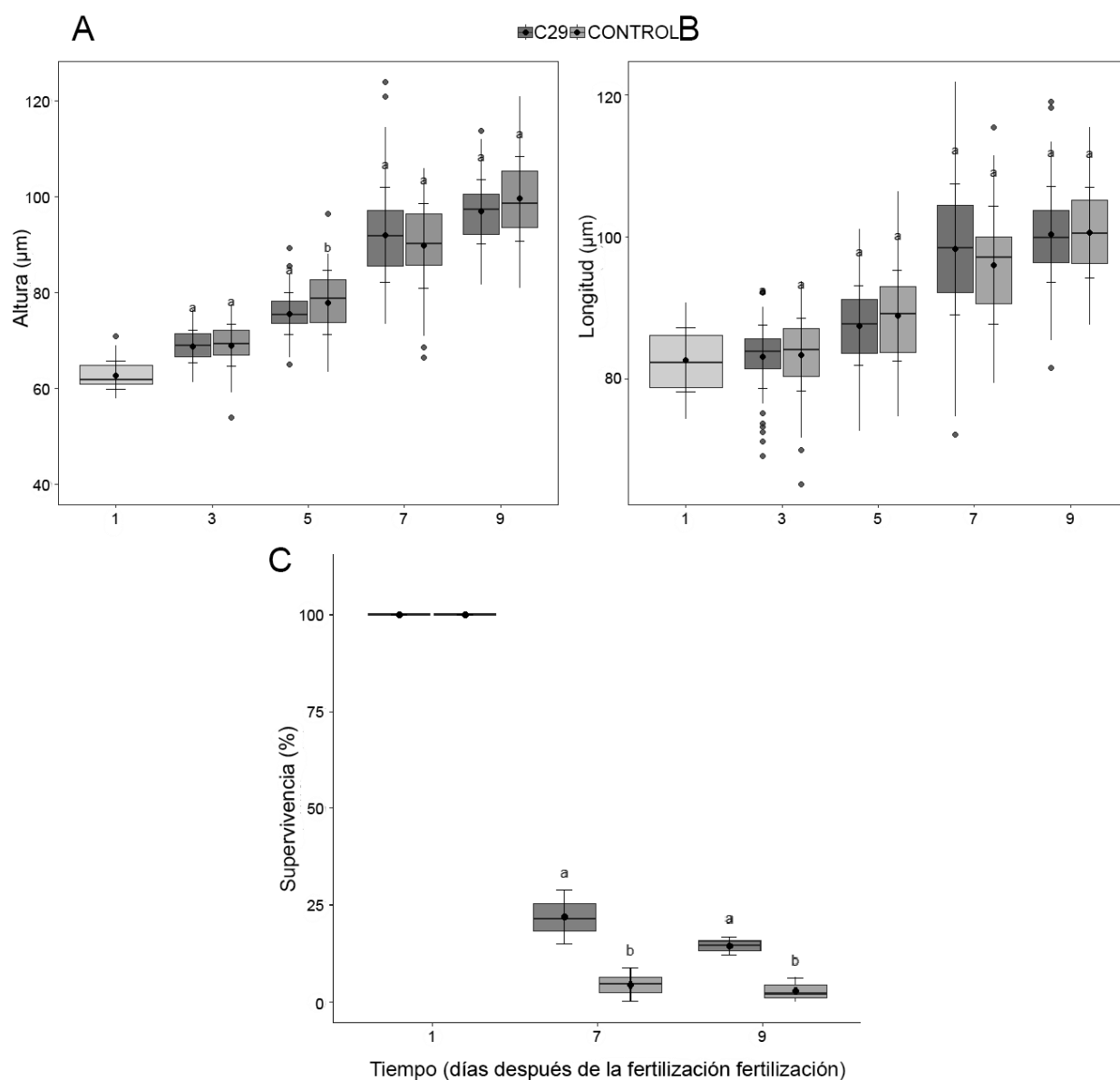


Figura 27. Evaluación del crecimiento larvario en conjunto con la cepa bacteriana C29. Mediana, percentiles 25 y 75 %, mínimo, máximo y valores atípicos de A) altura de la concha (μm), B) longitud de la concha (μm) y C) tasas de supervivencia larvaria (%) durante el periodo de cultivo. Las letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos por día de valuación ($P < 0.05$).

8. DISCUSIÓN

8.1 Acondicionamiento e inducción del desove de los reproductores

A pesar del riguroso régimen de acondicionamiento aplicado a los reproductores de *A. maura*, el proceso de inducción al desove fue ineficaz en los animales mantenidos en laboratorio. En contraste, la inducción al desove fue más exitosa en organismos madurados bajo condiciones naturales, logrando dos desoves exitosos (machos y hembras). Estos resultados difieren de los reportados, en los cuales *A. maura* obtuvo gametos de mejor calidad y cultivos larvarios favorables a partir de organismos sometidos a condiciones similares de laboratorio a las del presente estudio (Robles-Mungaray, 2004; Rodríguez-Jaramillo, 2004).

La limitada respuesta de los organismos a los estímulos térmicos aplicados estuvo acompañada de una melanización de los tejidos observada tanto en organismos silvestres recién capturados como en aquellos sometidos a períodos prolongados de acondicionamiento en el laboratorio, independientemente de su procedencia. No obstante, el lote de reproductores de BM presentó una producción de melanina más intensa. En los moluscos, la melanización del manto es un proceso común durante la formación de la concha (Waite y Wilbur, 1976). Todos los epitelios paleales, particularmente el epitelio externo del manto en contacto directo con la superficie interna de la concha y los tejidos mucosos en la interfaz con el medio ambiente externo de los organismos, han sido observados como participantes en la melanización (Allam y Raftos, 2015).

La melanización es un mecanismo de defensa inmune innato en invertebrados que limita eficazmente la propagación de infecciones mediante la cicatrización de heridas y la encapsulación de entidades extrañas. En ciertos casos, el proceso inmunológico de formación del nácar se inicia para proteger el manto frente a infecciones causadas por cuerpos externos (Muñoz *et al.*, 2006; Allam y Raftos, 2015). Esta hipótesis se ve respaldada por reportes documentados de una respuesta a infección por tremátodos en *M. edulis* (Jameson y Nicoll, 1913).

Histológicamente, la MEL en *A. maura* se observó predominantemente en individuos infectados con OTR, HEL y OTP. Este hallazgo sugiere una respuesta inmune frente a una infección análoga a la reportada en *C. virginica* y *R. philippinarum*. En estas especies, la síntesis de melanina en el

manto es una característica distintiva de las respuestas inmunes ante la enfermedad del ostión por *Roseovarius* y la enfermedad del anillo marrón en la almeja (Ford y Borrero, 2001; Paillard *et al.*, 2004).

De manera similar, la respuesta inflamatoria que sigue a una lesión celular se considera un mecanismo de defensa local dentro del tejido huésped (Cone, 2001). Estos mecanismos requieren una cantidad significativa de energía derivada de aquella destinada al metabolismo basal, crecimiento y/o reproducción. Los organismos pueden experimentar una reducción en su esfuerzo reproductivo a lo largo del tiempo, afectando así el reclutamiento poblacional (Luna *et al.*, 2017). Los hábitos filtradores de los moluscos bivalvos resultan en la exposición y potencial acumulación de una amplia variedad de microorganismos (Zannella *et al.*, 2017). Esta acumulación, junto con la exposición a un amplio espectro de estresores ambientales —incluyendo la fluctuación estacional de temperatura—, tiene el potencial de comprometer el sistema inmunológico de los bivalvos y aumentar la probabilidad de transmisión de enfermedades (Thieltges y Rick, 2006; Rahman *et al.*, 2019).

A través de observaciones histológicas, el presente estudio identificó diversas infecciones que pueden comprometer la salud de *A. maura*. De esta manera, la gran cantidad de agregaciones de CC encontradas en el tejido conectivo de todos los organismos estudiados, así como la intensa melanización observada a nivel macroscópico, pueden respaldar una respuesta inmune efectiva en *A. maura*. No obstante, la razón del incremento de CC asociados con diversas condiciones histopatológicas sigue siendo incierta. Por lo tanto, es posible que dicha acumulación contribuya a la desintoxicación de productos metabólicos generados durante una respuesta inflamatoria (Zaroogian y Yevich, 1994). La función más significativa atribuida a las CC en el contexto de la defensa interna es su papel en la eliminación de productos de degradación de parásitos muertos o moribundos, así como de subproductos metabólicos de parásitos activos. En este sentido, algunos estudios han observado un incremento de la pigmentación en *C. virginica* y otros ostiones infestados con anélidos del género *Polydora* y el cangrejo del ostión *Pinnotheres ostreum*, similar a las infecciones encontradas en el presente estudio por HEL, OTR y OTP.

Las agregaciones de CC contienen melanina o material similar a la lipofuscina, y previamente se han documentado como un mecanismo defensivo frente a la infección del tejido gonadal de *A. maura* por el nemátodo *Echinocephalus pseudouncinatus* en la Península de Baja California, México (Camacho *et al.*, 2023). De igual manera, las CC actúan como indicadores de estrés por metales y otros contaminantes (Zorita *et al.*, 2006; Arrighetti *et al.*, 2019), como se ha observado en la almeja *Megapitaria squalida*, y en el ostión *C. virginica*, que habitan en ambientes altamente contaminados (Yee-Duarte *et al.*, 2024).

Por otro lado, cada vez hay más reportes de que los hemocitos circulantes que participan en la defensa interna inmune están asociados a las superficies mucosas en las interacciones con microbios. Se les ha encontrado en abundancia en los compartimentos periféricos, como la cavidad extrapalial de los bivalvos (espacio entre el manto y la concha), donde se les atribuye una protección inmunitaria, ya que realizan fagocitosis de partículas bióticas y abióticas y de secreción de compuestos hidrolíticos y antimicrobianos. Ahí también participan en la biomineralización y la deposición de la concha ya que pueden realizar migración transepitelial (Allam y Raftos, 2015).

Por primera vez, el presente estudio encontró que los OTR con afinidad eosinofílica (acidófilos) en *A. maura* son capaces de causar daño en el epitelio del manto, branquias, tracto y glándula digestivos, tal como se ha reportado en *C. gigas* (Carvalho *et al.*, 2018). Finalmente, se detectaron células de OTP, aunque con baja prevalencia, en algunos tejidos de *A. maura*. Aunque serán necesarios análisis moleculares para confirmar la identidad de estas células, el protozoo parásito *Perkinsus marinus* ha sido hallado en otras muestras de *A. maura* así como en otras especies de bivalvos en la región (Cáceres *et al.*, 2008; Enríquez-Espinoza *et al.*, 2010; Cáceres *et al.*, 2012; Góngora *et al.*, 2016). Históricamente, este parásito ha causado mortalidades masivas en el ostión *C. virginica* (Andrews, 1988; Burreson, 1991). A pesar de la observación de infección por varios parásitos, no se registró mortalidad en el sistema de acondicionamiento de reproductores de *A. maura*.

Aun cuando en este estudio no se realizó un análisis reproductivo exhaustivo de *A. maura*, dado que no era su objetivo principal, se observó que el 100% de las hembras (ELP = 10, BM = 5)

presentaron reabsorción de gametos de febrero a junio. Estudios previos han documentado porcentajes bajos (14%–36%) de organismos de *A. maura* de la ELP en etapa de reabsorción de mayo a julio, con un 10% de hembras de BM en la misma etapa durante junio (Camacho-Mondragón, 2014). El porcentaje de organismos en fase de degeneración se ha observado que aumenta significativamente a partir de los 25°C, tanto en condiciones de laboratorio (Rodríguez-Jaramillo, 2004) como naturales (Camacho-Mondragón, 2014), alcanzando el 100% de los animales durante la temporada cálida.

Los hallazgos indican que un estado de salud comprometido en *A. maura* podría inducir la reabsorción de gametos como un mecanismo potencial para reponer energía durante los procesos de protección inmune. Este fenómeno podría ejercer un efecto negativo sobre la inducción al desove y, en consecuencia, sobre el desarrollo acuícola de la especie.

En consecuencia, se recomienda realizar una evaluación del estado de salud de este recurso en el noroeste de México, con el objetivo de seleccionar organismos sanos para el desarrollo de tecnología destinada a la producción de *A. maura* en laboratorios de cultivo.

8.2 Dosis, dieta e índice de ingestión

Aunque la producción de semilla de *A. maura* en condiciones controladas se ha intentado desde la década de 1970, el presente estudio confirma que las metodologías comúnmente aplicadas aún presentan limitaciones importantes (Chávez-Villalba *et al.*, 2022), particularmente aquellas derivadas de protocolos diseñados para otras especies, como *C. gigas* (Escamilla *et al.*, 2017), los cuales no satisfacen completamente los requerimientos biológicos de *A. maura*. Nuestros hallazgos demuestran que la cantidad y tipo de alimento suministrado durante la etapa larval son factores críticos que influyen directamente en el crecimiento y la supervivencia, reforzando la necesidad de generar estrategias de alimentación específicas para larvas de pinnidos, con especial atención en el callo de hacha *A. maura*.

Los resultados muestran que la dosis de alimento, el tamaño de partícula y la talla larval influyen significativamente en el crecimiento y la ingestión durante las primeras etapas del desarrollo de

A. maura. La respuesta observada al gradiente de alimentación indica un nivel de saturación cercano a 10,000 células·mL⁻¹ (dosis media), en el cual las larvas alcanzaron tallas comparables a las obtenidas con la dosis alta (20,000 células·mL⁻¹). Este patrón sugiere que aumentos adicionales en la concentración de alimento no mejoran el crecimiento, lo cual coincide con observaciones en otros bivalvos, donde las tasas de ingestión se estabilizan una vez alcanzada la concentración óptima (Rico *et al.*, 2009; Ángel *et al.*, 2021). Sin embargo, el nivel de saturación específico varía entre especies. Por ejemplo, *M. mercenaria* (Gallager, 1988), *Patinopecten yessoensis* (MacDonald, 1988) y *C. virginica* (Baldwin y Newell, 1995) presentan umbrales de saturación relativamente bajos (10–40 células µL⁻¹, T-ISO), mientras que *Ostrea edulis* (Crisp *et al.*, 1985) y *R. decussatus* (Pérez-Camacho *et al.*, 1994) alcanzan la saturación a concentraciones más altas (200–250 células µL⁻¹ usando *P. lutheri* o *I. galbana*). Estas diferencias interespecíficas reflejan variaciones en la adquisición de energía y en la capacidad de filtración. En *A. maura*, el crecimiento similar entre las dosis media y alta sugiere que un rango intermedio podría representar el nivel de alimentación óptimo, mejorando la gestión alimenticia y minimizando las partículas no ingeridas en los sistemas de cultivo.

La supervivencia a lo largo del bioensayo fue baja en todos los tratamientos, con una mortalidad acumulada superior al 99% al día 7. Este resultado concuerda con reportes previos para larvas de pinnidos, las cuales históricamente presentan alta mortalidad bajo condiciones controladas (Robles-Mungaray, 2004; Trigos *et al.*, 2018). Dichas pérdidas probablemente se deben a factores biológicos y ambientales combinados, incluyendo los requerimientos nutricionales específicos de la especie y su vulnerabilidad a infecciones bacterianas oportunistas (Luna *et al.*, 2002). El exceso de alimento residual (>90%) proveniente de dietas convencionales podría agravar la proliferación microbiana y el deterioro del agua (Rojas *et al.*, 1988). La supervivencia ligeramente mayor en la dosis media sugiere que tanto la composición del alimento como la concentración algal influyen en la reducción del estrés larval y en la estabilidad del ambiente de cultivo. No obstante, las diferencias no fueron estadísticamente significativas, lo que implica que *A. maura* podría requerir un rango estrecho de condiciones óptimas aún por definir experimentalmente.

El análisis del alimento residual indicó una eficiencia de filtración limitada durante el desarrollo temprano, sugiriendo restricciones fisiológicas para una ingestión efectiva. Tendencias similares han sido descritas en otros bivalvos, donde las larvas tempranas son incapaces de retener o procesar partículas más grandes (Riisgård *et al.*, 1980). Gallager (1988) reportó que las larvas ≤ 100 μm presentan un esófago estrecho y un volumen intestinal limitado, lo que restringe tanto el tamaño como la cantidad de partículas ingeridas. Durante esta fase mixotrófica, el metabolismo depende principalmente de reservas maternas (Bayne, 1983), y la ingestión de microalgas permanece baja. En *C. gigas*, este periodo dura 5–6 días (de larva D a umbo temprano), tras lo cual las tasas de ingestión aumentan conforme las larvas se vuelven completamente exotróficas (Rico *et al.*, 2009). En *A. maura*, las larvas umbonadas aparecen alrededor del día 13 (Hoyos-Chairez y Chávez-Villalba, 2023), lo que indica una transición retardada hacia la alimentación heterótrofa en comparación con otros bivalvos. Por tanto, la sobrealimentación durante la etapa mixotrófica podría empeorar la calidad del agua y favorecer la proliferación bacteriana en los tanques de criadero.

En el bioensayo de comparación de dietas, *P. lutheri* promovió tallas larvales significativamente mayores que *I. galbana*. Aunque la supervivencia fue similar en ambos tratamientos durante la mayor parte del experimento, se registró una mayor supervivencia con *P. lutheri* al día 5. Se observó un efecto nutricional retardado asociado a las diferencias en el tamaño celular entre especies. Las fluctuaciones en el tamaño de las células durante el cultivo probablemente afectaron la disponibilidad de partículas dentro del intervalo óptimo de ingestión. No obstante, la dosis de $15,000$ células· mL^{-1} , aplicada sin reposición y combinada con células más pequeñas, mejoró tanto la supervivencia como el crecimiento en comparación con el primer bioensayo.

Aunque *I. galbana* es ampliamente utilizada como alimento estándar en criaderos de bivalvos, su desempeño aquí fue inferior al de *P. lutheri*, lo que sugiere respuestas específicas por especie entre los pinnidos. Ninguna microalga por sí sola parece suficiente para satisfacer completamente los requerimientos nutricionales de *A. maura*. Dietas mixtas que combinen flagelados iguales o menores que *P. lutheri* con diatomeas finas podrían optimizar el suministro energético y la ingesta de ácidos grasos esenciales, mejorando el crecimiento y la supervivencia larval, como se ha reportado previamente para otros bivalvos (Brown *et al.*, 1997).

La ingestión selectiva de células más pequeñas como *P. lutheri* y la ingestión limitada de *C. muelleri* durante las etapas tempranas resaltan el papel central del tamaño de partícula en la alimentación larval. En especies como *C. gigas*, *A. ventricosus* y *R. philippinarum*, las partículas de 3–5 μm son óptimas para las larvas tempranas (Lora y Maeda, 1997; Helm *et al.*, 2006; Rico *et al.*, 2006). De manera similar, en la ostra perlera *Pteria sterna*, no se ha observado ingestión de *C. calcitrans* o *C. muelleri* durante los primeros 22 días de cultivo (Martínez *et al.*, 2004). De forma consistente, en este estudio *P. lutheri* no solo fue más fácilmente ingerida, sino que también resultó en un mayor tamaño larval, lo que sugiere ser mejor alimento primario para la fase inicial de cultivo de *A. maura* en comparación con *I. galbana*.

El MAG confirmó que la ingestión estuvo fuertemente relacionada con la altura de la concha, indicando que la capacidad de alimentación aumenta conforme crecen las larvas. *I. galbana* fragmentada y *C. muelleri* mostraron efectos no lineales significativos, lo que sugiere que tanto el tamaño de partícula como la integridad celular influyen en la eficiencia de ingestión. En contraste, *C. calcitrans*, *P. lutheri* e *I. galbana* íntegras no fueron significativas. La respuesta positiva a *I. galbana* fragmentada sugiere que la disrupción mecánica puede mejorar la disponibilidad y asimilación de nutrientes al reducir el tamaño celular y aumentar la eficiencia de captura durante las etapas tempranas.

Este patrón respalda la idea de que la eficiencia de ingestión en *A. maura* está limitada principalmente por la morfología larval y los mecanismos hidrodinámicos de captura de partículas durante la ontogenia temprana, siendo que a medida que las larvas aumentan de tamaño, la coordinación ciliar y la expansión del velo probablemente mejoran la manipulación y retención de partículas (Jørgensen, 1996; Troost *et al.*, 2008).

Se han explorado estrategias de alimentación alternativas en larvas de bivalvos con resultados variables. Las pastas de microalgas concentradas se han utilizado para simplificar las operaciones de criadero y reducir costos, obteniendo resultados aceptables en especies como *Saccostrea commercialis*, *C. gigas* y *M. mercenaria* (Nell y O'Connor, 1991; Brown y Robert, 2002; Hassan *et al.*, 2021). Las dietas microencapsuladas representan otra alternativa, permitiendo la inclusión de

ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFAs), proteínas hidrolizadas y pigmentos dentro de una matriz particulada estable. Estas dietas han mostrado potencial como sustitutos parciales de microalgas vivas en *C. virginica*, *C. gigas* y *Mytilus galloprovincialis* (Langdon y Waldock, 1981; Chu *et al.*, 1987; Campanati *et al.*, 2023). Además, las bacterias probióticas han ganado atención como alimentos complementarios y agentes de control biológico, mejorando la digestión larval, la resistencia al estrés y la supervivencia (Douillet y Langdon, 1994; Kesarcodi *et al.*, 2008).

Para *A. maura*, la integración de flagelados de pequeño tamaño, como *P. lutheri* o *I. galbana* fragmentada, con suplementos ricos en lípidos o formulaciones microencapsuladas puede representar una estrategia eficaz para apoyar la transición de la etapa mixotrófica a heterótrofa completa. Este enfoque alimenticio integrado podría optimizar el crecimiento, mejorar la supervivencia y elevar la calidad de la semilla en sistemas de criadero. Estos hallazgos subrayan la necesidad de adaptar la composición y el tamaño de las partículas alimenticias a la capacidad de filtración larval, particularmente en pinnidos, cuyas necesidades nutricionales siguen siendo poco comprendidas.

8.3 Fotoperiodo-desarrollo larvario

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que el fotoperiodo ejerció un efecto significativo sobre el crecimiento larvario de *A. maura*, siendo la condición de luz continua (24:0) la que favoreció de manera más notable el incremento en altura y longitud de la concha. Este patrón coincide con lo reportado para otras especies de invertebrados, en las que la exposición prolongada a la luz puede estimular la actividad alimentaria, incrementar la tasa metabólica y, en consecuencia, mejorar el crecimiento larvario (Sulkin, 1984; Minagawa y Murano, 1993; Minagawa, 1994; Gardner y Maguire, 1998). A pesar de ello, la supervivencia larvaria no mostró diferencias significativas entre tratamientos, aunque los valores fueron superiores bajo luz continua. Previamente Trigos *et al.*, (2018), reportaron altas mortalidades bajo condiciones de oscuridad total en larvas de *P. nobilis*, mientras que un régimen de 12:12 horas luz: oscuridad promovió una mayor supervivencia, por lo que es importante considerar incluso la calidad inicial de los reproductores y condiciones microbiológicas del agua, factores que se ha demostrado

influyen de manera determinante en la supervivencia larvaria de diferentes especies de bivalvos (Maeda, 2008; Rico *et al.*, 2009; Gómez *et al.*, 2023).

Las diferencias en las horas de luz parecieron no modificar los patrones de flotabilidad de las larvas en la columna de agua, ya que este comportamiento se observó de forma consistente bajo ambos fotoperiodos. Un hallazgo notable de este estudio, y que no ha sido previamente documentado, es que la flotabilidad larvaria puede actuar como un indicador de la supervivencia en condiciones de cultivo. La ausencia repentina de larvas flotantes se asoció consistentemente con el colapso total de la población, a diferencia de estudios anteriores en donde se atribuyen mortalidades masivas derivadas de la flotabilidad que presenta *A. maura* durante su desarrollo larvario en cautiverio (Robles-Mungaray, 2004, Maeda-Martínez, 2008).

8.4 Interacción bacteria-microalgas-larvas

La alimentación de bivalvos con microalgas vivas constituye un componente esencial para el desarrollo larvario, ya que proporciona nutrientes clave para el crecimiento y la supervivencia (Ziaei *et al.*, 2006). En este sentido, evaluar la interacción entre las microalgas utilizadas en los cultivos larvarios y las bacterias candidatas a probióticos es fundamental para identificar posibles efectos positivos o negativos que puedan comprometer el éxito de la producción. El presente estudio aporta evidencia sobre cómo las bacterias marinas pueden modular el crecimiento algal, un aspecto crítico dado que la disponibilidad y calidad del alimento influyen directamente en el desempeño larvario.

En los bioensayos *in vitro* realizados, el crecimiento de *I. galbana* mostró una mejora significativa en presencia de las suspensiones bacterianas durante el día 2, lo cual coincide con lo reportado por Sánchez *et al.*, (2020), quienes observaron un incremento en el crecimiento de *I. galbana* cuando fue cocultivada con *Bacillus subtilis*. Sin embargo, en este estudio, la respuesta no fue consistente entre microalgas: el co-cultivo de *C. calcitrans* con la cepa C26 resultó en una disminución significativa respecto al control durante el mismo periodo, un efecto también documentado por Sánchez *et al.*, (2020), quienes reportaron afectaciones en *C. calcitrans* bajo condiciones similares. Estas diferencias específicas entre especies pueden explicarse bajo el

marco propuesto por Grossart y Simon (2007), quienes indican que las interacciones microalga-bacteria dependen de la identidad bacteriana, la disponibilidad de nutrientes y las vitaminas disueltas en el medio.

A pesar de estas variaciones iniciales, en días posteriores (4 y 6) el crecimiento de *C. calcitrans* e *I. galbana* se mantuvo en ascenso sin diferencias significativas entre tratamientos y controles. Este patrón es consistente con relaciones mutualistas previamente descritas en la literatura donde la bacteria aporta vitaminas del complejo B o compuestos orgánicos reutilizables por las microalgas, mientras que estas proveen exudados carbonados que favorecen el crecimiento bacteriano (Avendaño y Riquelme, 1999; Subashchandrabose *et al.*, 2011; Fuentes *et al.*, 2016).

Por otro lado, el crecimiento bacteriano mostró dinámicas contrastantes según el medio de cultivo. Tanto C26 como C29 crecieron de forma más eficiente en TSB, como era esperado debido a su abundancia de nutrientes, mientras que en el medio F/2 se observó una reducción importante en la concentración bacteriana desde el día 2, situándose por debajo del inóculo inicial. Sin embargo, en el co-cultivo con microalgas ambas cepas se mantuvieron por encima de la concentración inicial, aun cuando mostraron una tendencia decreciente hacia el día 7. Este resultado refuerza la hipótesis de que las microalgas proveen compuestos orgánicos disueltos que facilitan la supervivencia bacteriana, aun en ambientes pobres en nutrientes.

La única interacción claramente negativa fue la observada entre la cepa C26 y *C. calcitrans*, que podría explicarse por un mecanismo de competencia por nutrientes o la producción de compuestos inhibitorios. Este tipo de relaciones se ha documentado en estudios de laboratorio, donde bacterias y algas compiten por elementos limitantes como el fósforo (Currie y Kalff, 1984), o donde las bacterias excretan sustancias tóxicas para las microalgas, reduciendo su crecimiento. En conjunto, los resultados del presente estudio concuerdan con la literatura que describe una amplia variedad de interacciones entre bacterias y microalgas, que pueden ser mutualistas, neutras o negativas dependiendo de las condiciones ambientales y las especies involucradas (Avendaño y Riquelme, 1999; Subashchandrabose *et al.*, 2011; Fuentes *et al.*, 2016). Estos hallazgos resaltan la necesidad de realizar pruebas preliminares antes de introducir bacterias como probióticos en sistemas de cultivo larvario, con el fin de asegurar que no afecten

adversamente la disponibilidad o calidad del alimento vivo. Por lo tanto, nuestros resultados refuerzan la idea de que no todas las cepas bacterianas serán compatibles con todas las microalgas, y que cada combinación debe evaluarse de forma individual antes de usarse en sistemas larvarios.

De todos los bioensayos larvarios realizados en el presente estudio, únicamente aquel en el que se adicionó la cepa bacteriana C29 a los tanques de cultivo mostró una mejora significativa en la supervivencia de *A. maura* con respecto al control. Aunque el efecto sobre crecimiento larvario fue menos marcado, las larvas tratadas con C29 también presentaron un incremento significativo en altura y longitud. Resultados similares han sido reportados previamente, como en el estudio de Soto-Simental (2015), donde la incorporación de microorganismos con potencial probiótico - incluyendo la levadura *Candida parapsilosis* y la bacteria *Bacillus licheniformis*- mejoró significativamente la supervivencia en cultivos larvarios de *A. maura*.

Es probable que el efecto positivo sobre el crecimiento haya sido parcialmente enmascarado por la elevada mortalidad registrada en el grupo control. A partir del día 5, este tratamiento presentó una disminución marcada en la supervivencia, afectando principalmente a las larvas de menor tamaño. Esta pérdida selectiva redujo artificialmente la variabilidad de tallas y elevó el promedio de crecimiento aparente en el grupo control. En contraste, la menor mortalidad observada en los cultivos con C29 permitió mantener una distribución más amplia de tallas y una representación más real del desarrollo larvario.

Los resultados sugieren que la cepa C29 pudo favorecer el desempeño larvario mediante la modificación del ambiente microbiano del cultivo. Entre los posibles mecanismos que se incluyen la competencia por nutrientes frente a bacterias oportunistas, la producción de metabolitos benéficos o su disponibilidad como partícula alimenticia suplementaria. Este último mecanismo es consistente con la evidencia de que diversos organismos acuáticos consumen bacterias como parte de su dieta. Se ha demostrado que las bacterias contribuyen a la nutrición de rotíferos, *Artemia* (Verschuere *et al.* 1999; Marques *et al.* 2006), copépodos (De Troch *et al.* 2012; Freese y Martin 2013), camarones y langostinos (Beecham 2008; Zhou *et al.*, 2009; Asaduzzaman *et al.*,

2010), bivalvos (Prieur *et al.* 1990; Beecham 2008; Arapov *et al.* 2010), abulones (Stott *et al.* 2004) y peces (Olafsen, 2001). Esta evidencia respalda la posibilidad de que C29 haya actuado como un recurso nutricional adicional disponible para las larvas de *A. maura*.

En las últimas décadas, la incorporación de microorganismos en sistemas acuícolas ha recibido considerable atención no solo por sus beneficios nutricionales, sino también por su capacidad para optimizar el reciclaje de nutrientes y mejorar la calidad del agua. Diversos sistemas multitróficos o integrados han sido desarrollados con estos fines (Crab *et al.*, 2012), incluyendo los sistemas biofloc (Avnimelech, 2012). Estos modelos buscan aprovechar la biomasa microbiana como un recurso nutritivo de alto valor, lo cual coincide con los resultados observados en el presente estudio, donde la interacción con la cepa C29 contribuyó al desempeño larvario.

Aunque C29 no presentó actividad antagónica frente a patógenos en las pruebas *in vitro* realizadas, su efecto positivo *in vivo* sugiere que otros mecanismos pueden estar involucrados. Se requiere profundizar en estudios que evalúen su potencial como fuente nutricional directa, así como su interacción con la comunidad microbiana del sistema de cultivo, para determinar su verdadera funcionalidad probiótica y su posible aplicación en esquemas de producción larvaria de *A. maura*.

9. CONCLUSIONES

El presente estudio generó aportes significativos para el fortalecimiento del cultivo larvario de *A. maura*, una especie nativa del Pacífico mexicano de alto valor económico y ecológico cuyo desarrollo acuícola ha sido históricamente limitado por la baja supervivencia durante su etapa larvaria en cautiverio. A partir de los experimentos realizados se concluye lo siguiente:

- El éxito en la inducción al desove depende en gran medida del estado fisiológico y sanitario de los reproductores.

Los organismos provenientes del ambiente natural mostraron mayor capacidad reproductiva que aquellos mantenidos en laboratorio, lo que evidencia la necesidad de optimizar las condiciones de acondicionamiento y considerar la influencia de infecciones parasitarias y melanización en la calidad de los gametos.

- La adecuación de la dieta constituye un factor determinante para el rendimiento larvario de *A. maura*.

El tamaño celular y la especie de la microalga utilizada influyen significativamente en el crecimiento y la ingestión larvaria. *P. lutheri* mostró ser más adecuada para las primeras etapas del desarrollo larvario en comparación con *I. galbana*, y la fragmentación celular mejoró la ingestión, confirmando que las larvas de *A. maura* presentan limitaciones fisiológicas al menos durante su fase mixitrófica.

- Las dosis alimenticias media y alta no generaron diferencias significativas en crecimiento, lo que sugiere la presencia de un umbral de saturación alimenticia con la dieta utilizada.

Estos resultados indican que concentraciones excesivas de microalgas no mejoran el desarrollo y pueden empeorar la calidad del agua de cultivo, lo cual es un factor crítico para una especie altamente susceptible.

- El fotoperiodo ejerce un efecto directo sobre el crecimiento larvario.

La luz continua (24:0) promovió un mayor crecimiento en altura y longitud de la concha. No obstante, no se observaron mejoras significativas en la supervivencia, Este resultado sugiere que el efecto principal del fotoperiodo es metabólico.

- Las interacciones bacteria-microalga dependen de la identidad de los microorganismos involucrados.

Mientras que la cepa C29 promovió el crecimiento de *I. galbana*, la cepa C26 generó efectos negativos sobre *C. calcitrans*. Esto confirma que cada combinación bacteria-microalga debe evaluarse de manera individual antes de su aplicación en laboratorios de producción.

- La cepa bacteriana C29 presentó efectos benéficos sobre la supervivencia y el crecimiento larvario de *A. maura*.

Aunque no mostró antagonismos *in vitro* frente a patógenos, su incorporación en los tanques incrementó significativamente la supervivencia y crecimiento, lo que sugiere un efecto probiótico indirecto o su potencial uso como alimento suplementario.

Finalmente, este estudio contribuye a sentar bases sólidas para futuros protocolos de producción de semilla mediante la evaluación de variables clave como la alimentación, fotoperiodo e interacción con bacterias marinas y sugiere dar un ajuste específico para el callo de hacha y no depender de protocolos diseñados para otras especies de bivalvos.

10. LITERATURA CITADA

- Ahumada, M. A., Serrano, S. J. y Ruiz, N. (2002). Abundancia, estructura poblacional y crecimiento de *Atrina maura* (Bivalvia:Pinnidae) en una laguna costera tropical del Pacífico mexicano. *Revista Biología Tropical*, 50: 1091-1100.
- Allam, B. y Raftos, D. (2015). Immune responses to infectious diseases in bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*, 30: 121-136. doi: 10.1016/j.jip.2015.05.005
- Andrews, J. D. (1988). Epizootiology of the disease caused by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* and its effects on the oyster industry. *American Fisheries Society*, 18: 47–63.
- Ángel, C. S., Serrano, J. y Ahumada, M. A. (2007). Ciclo reproductivo del molusco *Atrina maura* (Pterioidea: Pinnidae) en un sistema lagunar costero, al sur del Pacífico tropical mexicano. *Revista de Biología Tropical*, 55:839–852.
- Ángel, M. A., Nava, G. E., López, L., Carpizo, E., Castellanos, S., Correa, G. y García, Z. (2021). Effect of larval density and algal concentration on growth, survival and feeding rates of the scallop *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835). *Aquaculture Research*, 52(10): 4776–4785. doi: [10.1111/are.15311](https://doi.org/10.1111/are.15311)
- Ángel, M. A., Rodríguez, C., Cáceres, C. J. y Saucedo, P. E. (2010). Changes in Lipid content of oocytes of the pen shell *Atrina Maura* as a criterion of gamete development and quality: a study of histochemistry and digital image analysis. *Journal of Shellfish Research*, 29(2): 407–413. doi: [10.2983/035.029.0217](https://doi.org/10.2983/035.029.0217)
- Ángel, M.A., Arellano, M., Ceballos, B. P., Robles, M., Robles, E., Camacho, M.A. y Saucedo, P.E. (2015). Reproductive and larval performance of the pen shell *Atrina maura* in relation to the origin and condition of broodstock. *Journal of Shellfish Research*, 34(2): 401-408. doi: 10.2983/035.034.0223
- Ángel-Dapa, M. A. (2015). Evaluación de la dinámica energética y el desempeño reproductivo y larvario del callo de hacha *Atrina maura* (BIVALVIA: PINNIDAE). *Tesis de Doctorado*. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN, La Paz.
- Arapov, J., Ezgeta, D., Peharda, M. y Gladan, Z.N. (2010) Bivalve feeding – how and what they eat? *Ribarstvo*, 68: 105–116.
- Armstrong, E. J., Dubousquet, V., Mills, S. C. y Stillman, J. H. (2020). Elevated temperature, but not acidification, reduces fertilization success in the small giant clam, *Tridacna maxima*. *Marine Biology*, 167:1–10. Doi: 10.1007/s00227-019-3615-0
- Arndt, H. (1993). Rotifers as predators on components of the microbial web (bacteria, heterotrophic flagellates, ciliates) – a review. *Hydrobiologia*, 255: 231–246.
- Arrieche, D., Maeda, A.N., Farías, J.A. y Saucedo, P.E. (2010). Desempeño biológico del callo de hacha *Atrina maura* y el mejillón *Mytella strigata* en bajo diferentes regímenes de flujo de agua. *Ciencias Marinas*, 36(3): 237–248.
- Arrighetti, F., Landro, S. M., Lambre, M. E., Penchaszadeh, P. E. y Teso, V. (2019). Multiple-biomarker approach in the assessment of the health status of a novel sentinel mussel *Brachidontes rodriguezii* in a harbor area. *Marine Pollution Bulletin*, 140:151–161. doi: [10.1016/j.marpolbul.2019.02.002](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.02.002)
- Asaduzzaman, M., Wahab, M.A., Verdegem, M.C.J., Adhikary, R.K., Rahman, S.M.S. y Azim, M.E. (2010). Effects of carbohydrate source for maintaining a high C:N ratio and fish driven re-

- suspension on pond ecology and production in periphyton-based freshwater prawn culture systems. *Aquaculture*, 301: 37–46.
- Austin, B., Baudet, E. y Stobie, M. (1992). Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. *Journal of Fish Diseases*, 15: 55–61. doi: 10.1111/j.1365-2761.1992.tb00636.x
- Austin, B., Stuckey, L., Roberston, P., Effendi, I. y Griffith, D. (1995). A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing disease caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalli*. *Journal of Fish Diseases*, 18: 93–96. doi: 10.1111/j.1365-2761.1995.tb01271.x
- Avendaño, R.E. y Riquelme, C.E. (1999). Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae. *Aquaculture Research*, 30:893–900.
- Avnimelech, Y. (2012). *Biofloc Technology – A Practical Guide Book*. 2nd ed. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz, I., Cunningham, D., Vendrell, D. y Múzquiz, J. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114: 173–186. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.01.009.
- Baldwin, B. S. y Newell, R. I. E. (1995). Feeding rate responses of oyster larvae (*Crassostrea virginica*) to seston quantity and composition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 189: 77–91. doi: 10.1016/0022-0981(95)00013-H
- Barrow, R.K., Feltham, A (eds). 2009. Cowan and Steel's *Manual for the Identification of Medical Bacteria*. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK. doi.org/10.1017/CBO9780511527104
- Bayne, B. L. (1983). Physiological ecology of marine molluscan larvae. In: Verdonk, N. H. (Ed.), *The Mollusca*, Vol. III. Academic Press, New York, 299–343.
- Beecham, J. (2008). *A Literature Review on Particle Assimilation by Molluscs and Crustaceans*. CEFA contract C2706. Lowestoft.
- Berland, B. R., Bonin, D.J. y Maestrini, S.Y. (1970). Study of bacteria associated with marine algae in culture. *Marine Biology*, 5:68–76.
- Boudry, P. (2008). Review on breeding and reproduction of European aquaculture species, Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). *Aqua Breeding report*.
- Brierley, A.S. (2014). Diel vertical migration. *Current Biology*, 24 (22): R1074-R1076. doi: 10.1016/j.cub.2014.08.054
- Brown, M. R. (2002). Nutritional value and use of microalgae for aquaculture. En: Cruz, L. E., Ricque, D., Tapia, M., Gaxiola, M. G. y Simoes, N. (2002) *Avances en nutrición acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. Cancún, Quintana Roo, México. 3, 281–291.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K. y Dunstan, G. A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151(1-4): 315–331. doi: 10.1016/S0044-8486(96)01501-3
- Brown, M. y Robert, R. (2002). Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 207(3-4): 289–309. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00742-6
- Brugère, C. y Ridler, N. (2004). *Global aquaculture outlook in the next decades: an analysis of national aquaculture production forecasts to 2030*. *FAO Fisheries Circular*, 1001. FAO, Rome, 56p.
- Brusca, R.C. y Brusca, G.J. (2002). *Invertebrates*. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc., E.U.A. 936p.
- Burreson, E. M. (1991). Effects of *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*: I. Susceptibility of native and MSX-resistant stocks. *Journal of Shellfish Research*, 10: 417–423.

- Cáceres, J., García, M., Vásquez, R., de Pineda, T. J. y Stokes, N. A. (2012). Natural and cultured populations of the mangrove oyster *Saccostrea palmula* from Sinaloa, Mexico, infected by *Perkinsus marinus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110: 321–325. doi: [10.1016/j.jip.2012.03.019](https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.019)
- Cáceres, J., Vásquez, R., Padilla, G. y Del Río, M. A. (2008). *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of Mexico. *Journal of Invertebrate Pathology*, 99: 66–73. doi: [10.1016/j.jip.2008.03.005](https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.03.005)
- Camacho, M. A., Arellano, M. y Ceballos, B. P. (2008). Variation of the condition, muscle yield and mantle indices in *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae) in the Ensenada de la Paz, B.C.S., México. *Oceanides*, 23(1): 11-18. doi: 10.37543/oceanides.v23i1-2.40
- Camacho, M. A., Arellano, M. y Ceballos, B.P. (2012). Particular features of gonadal maturation and size at first maturity in *Atrina maura* (Bivalvia: Pinnidae). *Scientia Marina*, 76:539-548. doi: 10.3989/scimar.03522.05A
- Camacho, M. A., Ceballos, B. P., Rivera, A. R. y Arellano, M. (2014). Unnoticed sex change in *Atrina maura* (Bivalvia:Pinnidae): Histological and size structure evidence. *American Malacological Bulletin*, 33(1): 1-9. doi: 10.4003/006.033.0102
- Camacho, M. A., Ceballos, B. P., Uría, E., López, E. O. y Arellano, M. (2014b). Ultraestructure of the spermatogenic process in the penshell *Atrina maura* (BIVALVIA: PINNIDAE). *Malacología*, 57(2): 329-339. doi: 10.4002/040.057.0206
- Camacho, M.A., Morelos, R.M., Yee, J.A., Roldán, N. T. y Arellano, M. (2023). Advancing the knowledge of the nematode *Echinocephalus pseudouncinatus* (Gnathostomatidae, Spirurida): Morfological and molecular identification, new host, and host specificity in two coexisting pen shells (Bivalvia: Pinnidae). *Journal of Invertebrates Pathology*, 198:107923. doi: 10.1016/j.jip.2023.107923
- Camacho-Mondragón, M. A. (2014). Organización de la gónada, gametogénesis, sexualidad y variaciones estacionales y geográficas de las tácticas reproductivas del hacha china *Atrina maura* (SOWERBY, 1835) (BIVALVIA: PINNIDAE). *Tesis de doctorado*. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN, La Paz.
- Campa, A.I., Luna, A., Mazón, J.M., Aguirre, G., Ascencio, F. y González, H.A. (2011). Efecto de bacterias probióticas en el cultivo larvario del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (Bivalvia: Ostreidae). *Revista de Biología Tropical*, 59(1): 183-191.
- Campanati, C., Arantzamendi, L., Zorita, I., Juez, A. y Aldridge, D. C. (2023). Microencapsulated diets using thraustochytrids and macroalgae side streams for nursery rearing of *Mytilus galloprovincialis* spat. *Journal of the World Aquaculture Society*, 54(4): 994-1012. doi: [10.1111/jwas.12912](https://doi.org/10.1111/jwas.12912)
- Cardoza, F. y Maeda, A. N. (1997). An approach to aquacultural production of the penshell *Atrina maura* Sowerby, 1835 (Bivalvia: Pinnidae) in northwest Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 16(1): 311-319.
- Carvalho, L., Dimitrov, I. S. R., Jaramillo, C. R., García, A. y Gutiérrez, J. N. (2018). First report of an eosinophilic rickettsia-like organism in diseased oysters *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research*, 37:507–513. doi: [10.2983/035.037.0306](https://doi.org/10.2983/035.037.0306)
- Carvalho, Y. B., M., Ferreira, J.F., Da Silva, F.C. y Bercht, M. (2013). Factors influencing larval settlement of the Atlantic lion's paw scallop, *Nodipecten nodosus*. *Journal of Shellfish Research*, 32(3): 719-723. doi: 10.2983/035.032.0313.

- Ceballos, B.P., Arellano, M., García, F. y Villalejo, M. (2000). Reproductive cycle of the rugose pen shell, *Pinna rugosa* Sowerby, 1835 (Mollusca: Bivalvia) from Bahía Concepción, Gulf of California and its relation to temperature and photoperiod. *Journal of Shellfish Research*, 19:95-99.
- Cole, J.J. (1982). Interaction between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13:291–314.
- Cole, J.J., Findlay, S. y Pace, M.L. (1988). Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross system overview. *Marine Ecology Progress Series*, 43: 1–10.
- CONAPESCA. (2023). *Datos Abiertos de México - Producción Pesquera*. Disponible en: <https://datos.gob.mx/busca/dataset/produccion-pesquera>.
- Cone, J. B. (2001). Inflammation. *American Journal of Surgery*, 182:558–562. doi: [10.1016/s0002-9610\(01\)00822-4](https://doi.org/10.1016/s0002-9610(01)00822-4)
- Contreras, R., Pacheco, E. y Puebla, C. (2014). Desarrollo embrionario y larval temprano de *Gari solida* (Gray, 1828) (Bivalvia: Psammobiidae). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 42(1): 283-288. doi: [/10.3856/vol42-issue1-fulltext-25](https://doi.org/10.3856/vol42-issue1-fulltext-25)
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P. y Verstraete, W. (2012). Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. *Aquaculture*, 356: 351–356. doi: [10.1016/j.aquaculture.2012.04.046](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.046)
- Crisp, D. J., Yule, A. B. y White, K. N. (1985). Feeding by oyster larvae: the functional response, energy budget and a comparison with mussel larvae. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 65: 759–783. doi: [10.1017/S0025315400052589](https://doi.org/10.1017/S0025315400052589)
- Cruz, R., Rodríguez, C., Marín, E., Campa, Á. I., Barajas, J. D. y Cruz, P. (2025). Generalized melanization and histopathological observations in broodstock of pen shell *Atrina maura*. *Journal of Shellfish Research*, 44(2): 211-220. doi: [10.2983/035.044.0204](https://doi.org/10.2983/035.044.0204)
- Currie, D. J. y Kalff, J. (1984). A comparison of the abilities of freshwater algae and bacteria to acquire and retain phosphorus. *Limnology and Oceanography*, 29(2): 298-310.
- Chávez, J., Reynaga, F. D. J. y Hoyos, F. (2022). Worldwide overview of reproduction, juvenile collection, spat production and cultivation of pen shells. *Reviews in Aquaculture*, 14(3): 1371–1388. doi: [10.1111/raq.12654](https://doi.org/10.1111/raq.12654)
- Chu, F. L. E., Webb, K. L., Hepworth, D. A. y Casey, B. B. (1987). Metamorphosis of larvae of *Crassostrea virginica* fed microencapsulated diets. *Aquaculture*, 64(3): 185-197.
- Dang, C., de Montaudouin, X., Gam, M., Paroissin, C., Bru, N. y Caill-Milly, N. (2010). The manila clam population in Arcachon Bay (SW France): can it be kept sustainable? *Journal of Sea Research*, 63:108–118. doi: [10.1016/j.seares.2009.11.003](https://doi.org/10.1016/j.seares.2009.11.003)
- De Troch, M., Boeckx, P., Cnudde, C., Van Gansbeke, D., Vanreusel, A. y Vincx, M. (2012). Bioconversion of fatty acids at the basis of marine food webs: insights from a compound-specific stable isotope analysis. *Marine Ecology Progress Series*, 465:53–67. Doi: 10.3354/meps09920
- DOF. (2018). *Acuerdo por el que se da a conocer la actualización de la Carta Nacional Pesquera*. Diario Oficial de la Federación, México. https://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5525712.
- DOF. (2021). *Acuerdo mediante el cual se aprueba la actualización de la Carta Nacional Acuícola*. Diario Oficial de la Federación, México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/630145/DOF_-_Diario_Oficial_de_la_Federaci__n_CNA.pdf.
- Douillet, P. A. y Langdon, C. J. (1994). Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture*, 119(1): 25-40.
- Ducklow, H.W. (1983). Production and fate of bacteria in the oceans. *BioScience*, 33: 494–501.

- Ducklow, H.W. (2000). Bacterial production and biomass in the oceans. In: Kirchman, D.L. (ed.) *Microbial ecology of the oceans*. John Wiley y Sons, New York. 85-120pp.
- Elston, R.A. (1984). Prevention and management of infectious diseases in tensive mollusk husbandry. *Journal of the World Mariculture Society*, 15: 284-300. doi: 10.1111/j.1749-7345.1984.tb00163.x
- Ellis, S.C. (1997). Spawning and early larval rearing of giant clams (Bivalvia: Tridacnidae). Waimanalo, Hawaii. Center for Tropical and Subtropical Aquaculture, 130: 1-55.
- Enríquez, M., Cáceres, C., Chavez, J., Le Pennec, G. y Le Pennec, M. (2003). Gametogenesis of *Atrina maura* (Bivalve:Pinnidae) under artificial conditions. *Invertebrate Reproduction and Development*, 43(2): 151-161. doi: 10.1080/07924259.2003.9652534
- Enríquez, T., Grijalva, J., Castro, R. y Ramos, J. (2010). *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. *Diseases of Aquatic Organisms*, 89: 269–273. doi: 10.3354/dao02199
- Escamilla, R., Diarte, G., Luna, A., Fierro, J.A., Esparza, H.M., Granados, S. y Ruiz, C.A. (2017). Ecology, fishery and aquaculture in Gulf of California, Mexico: pen shell *Atrina maura* (Sowerby, 1835). In: *Organismal and Molecular Malacology*. InTechOpen, 3–21. doi: 10.5772/68135
- FAO. (2020). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción*. FAO, Rome. <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/c2ca78a8-47c8-42f3-8b9a-4d7b30259e6c/content>.
- Farías, A. (2008). Nutrición y alimentación en moluscos bivalvos. En: *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América latina*. Taller Técnico Regional de la FAO. FAO, Roma. 12: 297-308.
- Farías, A. y Uriarte, I. (2002). Nutrición en larvicultura de pectínidos: relevancia de proteínas y lípidos. *Avances en Nutrición Acuicola*, 309-313.
- Ford, S. E. y Borrero, F. J. (2001). Epizootiology and pathology of juvenile oyster disease in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Invertebrates Pathology*, 78:141–154. doi: [10.1006/jipa.2001.5052](https://doi.org/10.1006/jipa.2001.5052)
- Freese, H.M. y Martin, D. (2013). Food quality of mixed bacteria–algae diets for *Daphnia magna*. *Hydrobiologia*, 715: 63–76.
- Fuentes, J., Garbayo, I., Cuaresma, M., Montero, Z., González, M. y Vílchez, C. (2016). Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds. *Marine Drugs*, 14:100. doi: 10.3390/md14050100
- Gallager, S. M. (1988). Visual observations of particle manipulation during feeding in larvae of a bivalve mollusk. *Bulletin of Marine Science*, 43(3): 344–365.
- Gardner, C. y Maguire, G.B. (1998). Effect of photoperiod and light intensity on survival, development and cannibalism of larvae of the Australian giant crab *Pseudocarcinus gigas* (Lamarck). *Aquaculture*, 165 (1-2): 51-63. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00245-2.
- Garriques, D. y Arevalo, G. (1995). An evaluation of the production and use of a live bacterial silage to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* post larva in Ecuador. In Larvi 95-Fish and Shellfish Larviculture Symposium. Ghent, Belgium. European Aquaculture Society, Special Publication, 24: 53-54.
- Gibson, L.F., Woodworth, J. y George, A.M. (1998). Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture*, 169 (1-2): 111-120. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00369-X.
- Goldchain-Goldin Y. L. (2010). Estudio comparativo de crecimiento y supervivencia de las larvas flotadoras y nadadoras del hacha china *Atrina maura* (Sowerby, 1835) bajo condiciones de

- cultivo intensivo. *Tesis de Licenciatura*. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz B.C.S.
- Gómez, B., Ro. A, y Turnbull, J.F. (2000). The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 191(1-3): 259-270.
- Gómez, E., Acosta, H., Mazón, J. M. y Saucedo, P. E. (2023). Seasonal variation in the reproductive and larval performance of the winged pearl oyster *Pteria sterna* associated with anomalous environmental conditions. *Ciencias Marinas*, 49:e3353. doi: 10.7773/cm.y2023.3353
- Gómez, M.M., Carvalho, L., Ocampo, L. y Cruz, A. (2019). First record of the nematode *Echinocephalus pseudouncinatus* (Gnathostomatidae: Spirurida) in an edible commercial host, the pen shell *Atrina maura* (Bivalvia: Pinnidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 167: 107249. doi: 10.1016/j.jip.2019.107249
- Gómez-Hernández, C. E. (2011). Crecimiento somático y mortalidad del “callo de hacha chino” *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Mollusca: Bivalvia) durante su cultivo larvario. *Tesis Doctoral*. Universidad del Mar. Oaxaca.
- Gómez-Valdez, M. M. (2019). Características de la biología reproductiva de dos especies de callos de hacha de importancia comercial en laguna ojo de liebre, baja california sur: *Atrina maura* y *Pinna rugosa*. *Tesis de doctorado*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. La Paz B.C.S.
- Góngora, A. M., Hernández, J.A., Domínguez, A.L., Villanueva, B.P. y García, M. (2015). Crecimiento, supervivencia y condición del callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae) en el estero La Piedra, Sinaloa, México. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 19(3): 73–86.
- Góngora, A. M., Rubio, F., Villanueva, L. C., Alvarez, E., Muñoz, N. P., Hernández, J. A. y García, M. (2016). Primer registro de *Perkinsus* sp. (Protozoa, Apicomplexa) en el callo de hacha *Atrina maura* en Sinaloa, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 51(3): 689-694. doi: 10.4067/S0718-19572016000300020
- Góngora, A.M., García, M., Domínguez, A.L. y Hernández, J.A. (2011). Crecimiento del callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Bivalvia: Pinnidae) cultivado a diferentes densidades. *Avances de Investigación Agropecuaria*, 15(2):79-94.
- Góngora, A.M., García, M., Hernández, J.A., Domínguez, A.L. y Sainz, J.C. (2016). Crecimiento y supervivencia del callo de hacha *Atrina maura* (Bivalvia) cultivado en la costa sureste del Golfo de California, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 51(3): 535-547. doi: 10.4067/s0718-19572016000300017
- González-Corona, J. (2003). Estudio de la fisiología reproductiva y gametogénesis del callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby. 1835). *Tesis de Maestría*. Universidad de Sonora, Hermosillo.
- Gosling, E. (2003). Bivalve molluscs: biology, ecology and culture. Fishing News Books. Oxford. 443p.
- Gram, L., Melchiorson, J., Spanggaard, B., Huber, I. y Nielsen, T.F. (1999). Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied Environmental Microbiology*, 65: 969-973. doi: 10.1128/aem.65.3.969-973.1999.
- Grossart, H.P. (2010). Ecological consequences of bacterioplankton lifestyles: changes in concepts are needed. *Environmental Microbiology Reports*, 2: 706–714. doi: [10.1111/j.1758-2229.2010.00179.x](https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00179.x)
- Grossart, H.P. y Simon, M. (2007). Interactions of planktonic algae and bacteria: effects on algal growth and organic matter dynamics. *Aquatic Microbial Ecology*, 47:163–176. doi: [10.3354/ame047163](https://doi.org/10.3354/ame047163).
- Guillard, R.R.L. (1959). Further evidence of the destruction of bivalve larvae by bacteria. *The Biological Bulletin*, 117:258–266. doi: 10.2307/1538905.

- Harzevili, A.R.S., Van Duffel, H., Dhert, P., Swings, J. y Sorgeloos, P. (1998). Use of a potential probiotic *Lactobacillus lactis* Ar21 strain for the enhancement of growth in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Müller). *Aquaculture Research*, 29: 411-417. doi: 10.1046/j.1365-2109.1998.00217.x
- Hassan, M. M., Parks, V. y Laramore, S. (2021). Optimizing microalgae diets for hard clam, *Mercenaria mercenaria*, larvae culture. *Aquaculture Reports*, 20: 100716. doi: [10.1016/j.aqrep.2021.100716](https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100716)
- Helm, M.M., Bourne, N. y Lovatelli, A. (2006). *Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico*. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 471, FAO, Roma. 184p.
- Hoyos, F. y Chávez, J. (2023). Growth and survival analysis of early stages in the pen shell *Atrina maura* during pilot-commercial production. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 51: 530–542. doi: [10.3856/vol51-issue4-fulltext-3048](https://doi.org/10.3856/vol51-issue4-fulltext-3048)
- INAPESCA. (2012). *Acuerdo por el que se da a conocer el Plan De Manejo Para La Pesquería De Almeja Generosa (Panoepa Spp.) En Las Costas De Baja California, México*. SAGARPA. https://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5240641.
- INAPESCA. (2021). *Manual de transferencia tecnológica cultivo de almeja “callo de hacha” Atrina maura* (Sowerby, 1835). https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/718949/1MANUAL_Atrina_maura.pdf.
- Inglis, V. (1996). *Antibacterial chemotherapy in aquaculture: review of practice, associated risks and need for action*. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland.
- Jameson, H. L. y Nicoll, W. (1913). On some parasites of the scoter duck (*Oedemia nigra*), and their relation to the pearl-inducing trematode in the edible mussel (*Mytilus edulis*). *Proceedings of the Zoological Society of London*, 83(1): 53–63.
- Jørgensen, C. B. (1996). Bivalve filter feeding revisited. *Marine Ecology Progress Series*, 142: 287-302.
- Keen, A. M. (1971). *Seashells of tropical west America. Marine mollusks from Baja California to Peru*. Stanford University Press, 1025.
- Kesarcodi, A., Kaspar, H., Lategan, M.J. y Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274:1-14. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.11.019
- Kesarcodi, A., Miner, P., Nicolas, J. y Robert, R. (2012). Protective effect of four potential probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), flat oyster (*Ostrea edulis*) and scallop (*Pecten maximus*). *Aquaculture*, 344– 349: 29–34. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.02.029.
- Kheder, R. B., Quéré, C., Moal, J. y Robert. R. (2010). Effect of nutrition on *Crassostrea gigas* larval development and the evolution of physiological indices. Part A: Quantitative and qualitative diet effects. *Aquaculture*, 305(1): 165-173. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.04.022.
- Kumar, V., Roy, S. y Meena, D. K. y Kumar, U. (2016). Application of probiotics in shrimp aquaculture: importance, mechanisms of action, and methods of administration. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 24 (4): 342-368. doi: [10.1080/23308249.2016.1193841](https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1193841)
- Langdon, C., y Waldock, M. J. (1981). The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 61(2): 431-448.
- Leal, S., Barraza, R., Castro, R., Chávez, J. y Hoyos, F. (2011). Cultivation of pen shells: An example with *Atrina maura* in Northwestern Mexico. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(6): 789-800. doi: [10.1111/j.1749-7345.2011.00528.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2011.00528.x)

- Lertcanawanichakul, M. y Sawangnop, S. (2008). A comparison of two methods used for measuring the antagonistic activity of *Bacillus* species. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 5(2): 161-171.
- Lewis, T., Nichols, P.D., Hart, P.R., Nichols, D.S. y McMeekin, T.A. (1998). Enrichment of rotifers *Brachionus plicatilis* with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid produced by bacteria. *Journal of the World Aquaculture Society*, 29: 313-318. doi: 10.1111/j.1749-7345.1998.tb00652.x
- Leyva-Valencia, I. (1999). Termotolerancia, halotolerancia y temperatura optima en juveniles de callo de hacha (*Atrina maura* Sowerby, 1835). *Tesis de Licenciatura*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Liu, W., Pearce, C.M., Alabi, A.O. y Gurney, H. (2009). Effects of microalgal diets on the growth and survival of larvae and post larvae of the basket cockle, *Clinocardium nuttalli*. *Aquaculture*, 293(3-4): 248-254. doi: 0.1016/j.aquaculture.2009.04.032.
- Lloor-Mera, A.G. (2012). Desarrollo de protocolos de manejo para la inducción al desove y larvicultura de la ostra nativa *Crassostrea iridescens* (Hanley, 1854). *Tesis de Licenciatura*. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador.
- Lora, M. C., Ruiz, E., Reynoso, T. y Voltolina, D. (2004). Evaluation of five microalgae diets for juvenile pen shells *Atrina maura*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 35(2): 232-236. doi: 10.1111/j.1749-7345.2004.tb01079.x
- Lora, M.C. y Maeda, A. N. (1997). Ingestion and digestion index of Catarina scallop *Argopecten ventricosus-circularis*, Sowerby II, 1842, veliger larvae with ten microalgae species. *Aquaculture Research*, 28: 905-910. doi: 10.1046/j.1365-2109.1997.00917.x
- Luna, A., Maeda, A. N. y Sainz, J. C. (2002). Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strain. *Diseases of Aquatic Organisms*, 49: 221-226. doi: 10.3354/dao049221
- Luna, A., Maeda, A. N., Ascencio, F. Robles, M. (2004). Ontogenetic variations of hydrolytic enzymes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish and Shellfish Immunology*, 16:287–294. doi: 10.1016/S1050-4648(03)00110-4
- MacDonald, B. A. (1988). Physiological energetics of Japanese scallop *Patinopecten yessoensis* larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 120: 155–170. doi: [10.1016/0022-0981\(88\)90086-X](https://doi.org/10.1016/0022-0981(88)90086-X)
- Macey, B.M. y Coyne, V.E. (2005). Improved growth rate and disease resistance in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture*, 245:249-261. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.11.031
- MacFaddin, J. F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Ed. Médica Panamericana, Argentina.
- Maeda, A. N. (2008). Estado actual del cultivo de bivalvos en México. En: Lovatelli, A., Farías, A. y Uriarte, I. (eds). *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina*. Taller Técnico Regional de la FAO, 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura*. No. 12. Roma, FAO. 91-100.
- Marques, A., Thanh, T.H., Sorgeloos, P. y Bossier, P. (2006). Use of microalgae and bacteria to enhance protection of gnotobiotic *Artemia* against different pathogens. *Aquaculture*, 258:116–126. doi: [10.1016/j.aquaculture.2006.04.021](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.021)
- Marshall, R., Mckinley, S. y Pearce, C.M. (2010). Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves. *Reviews in Aquaculture*, 2:33–55. doi: 10.1111/j.1753-5131.2010.01022.x

- Melguizo-Robles, A. (2011). Producción de larvas y semillas del callo de hacha *Atrina maura* (Sowwerby, 1835) en el laboratorio experimental de acuicultura de Pichilingue de la Universidad Autónoma de Baja California Sur. *Tesis de Licenciatura*. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S.
- Mendo, T., Koch, V., Wolff, M., Sínsel, F. y Ruiz, C. (2011). Feasibility of intertidal bottom culture of the penshell *Atrina maura* in Bahía Magdalena, Baja California Sur, Mexico. *Aquaculture*, 314(1–4): 252–260. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.01.044
- Minagawa, M. (1994). Effects of photoperiod on survival, feeding and development of larvae of the red frog crab, *Ranina ranina*. *Aquaculture*, 120 (1-2): 105-114. doi: 10.1016/0044-8486(94)90226-7.
- Minagawa, M. y Murano, M. (1993). Effects of prey density on survival, feeding rate and development of zoeas of the red frog crab *Ranina ranina* (Crustacea, Decapoda, Raninidae). *Aquaculture*, 113 (1-2): 91-100. doi: 10.1016/0044-8486(93)90343-W.
- Miranda, L.E., Valenzuela, F., Acosta, H., López, L.L., Granados, A., Ramírez, J.L. y Cruz, P. (2025). Comparative diploid vs. triploid Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) grow-out performance in two contrasting environments in Baja California Sur. *Aquaculture*, 742: 716. doi: [10.1016/j.aquaculture.2025.742716](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2025.742716).
- Montes-Orozco, V. (2014). Efecto de dietas monoalgales y mixtas de *Isochrysis sp* y *Chaetoceros calcitrans* en el desarrollo larval de la almeja *Panopea generosa*. *Tesis de Maestría*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada.
- Múgica, M., Sokolova, I. M., Izagirre, U. y Marigomez I. (2015). Season dependent effects of elevated temperature on stress biomarkers, energy metabolism and gamete development in mussels. *Marine. Environmental. Research*, 103:1–10. doi: [10.1016/j.marenvres.2014.10.005](https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.10.005)
- Muñoz, P., Meseguer, J. y Esteban, M. A. (2006). Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 20:12–19. doi: [10.1016/j.fsi.2005.02.002](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.02.002)
- Nell, J. A. y O'Connor, W. A. (1991). The evaluation of fresh algae and stored algal concentrates as a food source for Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale y Roughley), larvae. *Aquaculture*, 99(3-4): 277-284.
- Nichols, D.S. (2003). Prokaryotes and the input of polyunsaturated fatty acids to the marine food web. *FEMS Microbiology Letters*, 219: 1–7. doi: [10.1016/S0378-1097\(02\)01200-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01200-4)
- Nogami, K. y Maeda, M. (1992). Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49: 2373-2376. doi: 10.1139/f92-261
- Okon, E.M., Birikorang, H.N., Munir, M.B., Kari, Z.A., Tellez-Isaias, G., Khalifa, N.E., Abdelnour, S.A., Eissa, M.E.H., Al-Farga, A., Dighiesh, H.S. y Eissa, E.-S.H. (2023). A global analysis of climate change and the impacts on oyster diseases. *Sustainability*. 15, 12775. doi: [10.3390/su151712775](https://doi.org/10.3390/su151712775)
- Olafsen, J.A. (2001). Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*, 200: 223–247. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00702-5
- Paillard, C., Le Roux, F. y Borrego, J. J. (2004). Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution. *Aquatic Living Resources*, 17(4):477–498. doi: [10.1051/alr:2004054](https://doi.org/10.1051/alr:2004054)
- Palacios, J., Herrera, J., Rodríguez, S., Brunkow, J. y Molina, R. (2018). Evaluating the bio-economic performance of a Callo de hacha (*Atrina maura*, *Atrina tuberculosa* y *Pinna rugosa*) fishery

- restoration plan in La Paz, Mexico. *PLoS ONE*, 13(12): e0209431. doi: 10.1371/journal.pone.0209431
- Parwadani, L. (2011). Review: Spawning induction in bivalve. *Journal Penelitian Sains*, 14(2): 33-36.
- Peharda, M. y Vilibić, I. (2008). Modelling the recruitment effect in a small marine protected area: the example of saltwater lakes on the Island of Mljet (Adriatic Sea). *Acta Adriatica*, 49:25–35.
- Pérez, A., Belras, R. y Albentosa, M. (1994). Effects of algal food concentration and body size on the ingestion rates of *Ruditapes decussatus* (Bivalvia) veliger larvae. *Marine Ecology Progress Series*, 115: 87–92.
- Pettersen, A. K., Turchini, G.M., Jahangard, S., Ingram, B.A. y Sherman, C.D.H. (2010). Effects of different dietary microalgae on survival, growth settlement and fatty acid composition of blue mussel (*Mytilus galloprovincialis*) larvae. *Aquaculture*, 309(1): 115-124. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.09.024
- Phillips, N.W. (1984) Role of different microbes and substrates as potential suppliers of specific, essential nutrients to marine detritivores. *Bulletin of Marine Science*, 35: 283–298.
- Ponis, E., Probert, I., Véron, B., Le Coz, J.R., Mathieu, M. y Robert, R. (2006). Nutritional value of six Pavlovophyceae for *Crassostrea gigas* and *Pecten maximus* larvae. *Aquaculture*, 254(1): 544-553. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.11.017.
- Porter, K.G., Feig, Y.S. y Vetter, E.F. (1983). Morphology, flow regimes, and filtering rates of *Daphnia*, *Ceriodaphnia* and *Bosmina* fed natural bacteria. *Oecologia*, 58: 156–163.
- Poutiers, J.M. (1995). Bivalvos. En: Fischer, W., Krupp, F., Schneider, W., Sommer, C., Carpenter, K.E. y Niem, V.H. (1995). *Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro oriental*. FAO, Roma. 1: 598.
- Prado, S., Romalde, J.L., Montes, J. y Barja, J.L. (2005). Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. *Diseases of Aquatic Organisms*, 67(449): 209–215. doi: 10.3354/dao067209.
- Prieur, D., Mevel, G., Nicolas, J.L., Plusquellec, A. y Vigneulle, M. (1990). Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanography and Marine Biology- An Annual Review*, 28: 277–352.
- Pruzzo, C., Gallo, G. y Canesi, L. (2005). Persistence of vibrios in marine bivalves: The role of interactions with haemolymph components. *Environmental Microbiology*, 7:761–772. doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00792.x
- Rahman, M. A., Henderson, S., Miller-Ezzy, P., Li, X. X. y Qin, J. G. (2019). Immune response to temperature stress in three bivalve species: Pacific oyster *Crassostrea gigas*, Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and mud cockle *Katylsia rhytiphora*. *Fish and Shellfish Immunology*, 86:868–874. doi: 10.1016/j.fsi.2018.12.017
- Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S. y Menasaveta, P. (2000). Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus S11*). *Aquaculture*, 191: 271-288. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00440-3.
- Reynoso, G. T., Maeda, M. A. N., Cardoza, V. F. y Monsalvo, S. P. (1996). Cultivo de hacha *Atrina maura*. En: Casas, M. y Ponce, G. (eds). *Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur, México*. CIBNOR-CRIP, CICIMAR, FAO. La Paz, B.C.S., México.
- Rico, B., Le Coz, J.R., Mingant, C. y Robert, R. (2006). Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 256(1): 377-388. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.02.015.

- Rico, B., Pouvreau, S. y Robert, R. 2009. Influence of food density and temperature on ingestion, growth and settlement of Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 287: 395–401. doi: [10.1016/j.aquaculture.2008.10.054](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.054).
- Riisgård, H. U., Randløv, A. y Kristensen, P. S. (1980). Rates of water processing, oxygen consumption and efficiency of particle retention in veligers and young post-metamorphic *Mytilus edulis*. *Ophelia*, 19: 37–46. doi: [10.1080/00785326.1980.10425505](https://doi.org/10.1080/00785326.1980.10425505)
- Riquelme, C. E., Avendaño-Herrera, R.E. 2003. Microalgae and bacteria interaction in the aquatic environmental and their potential use in aquaculture. *Revista chilena de Historia Natural*, 76: 725-736.
- Riquelme, C. E., Fukami, K. y Yuzaburo, I. (1987). Annual fluctuations of phytoplankton and bacterial communities in Maizuru Bay and their interrelationship. *Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology*, 1:29–37. doi: [10.1264/microbes1986.2.29](https://doi.org/10.1264/microbes1986.2.29)
- Riquelme, C., Araya, R. y Escribano, R. (2000). Selective incorporation of bacteria by *Argopecten purpuratus* larvae: implications for the use of probiotics in culturing systems of the Chilean scallop. *Aquaculture*, 181:25–36. doi: [10.1016/S0044-8486\(99\)00225-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00225-2).
- Robertson, P.A.W., Dowd, C.O., Burrels, C., Williams, P. y Austin, B. (2000). Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture*, 185: 235-243. doi: [10.1016/S0044-8486\(99\)00349-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00349-X).
- Robles-Mungaray, M. (2004). Desarrollo de la biotecnología para la producción de semilla en laboratorio, diploide y triploide, de callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835). *Tesis de Maestría*. Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz B.C.S.
- Robles-Mungaray, M., Serrano, G. I. S. y Hoyos, C. F. J. (1996). Cultivo de larvas y producción de semilla de callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (Mollusca: Pinnidae) en el CREMES de Bahía Kino, Sonora, México. En: Book of Abstracts, International Symposium of Marine Biology, La Paz, B.C.S. Mexico.
- Robles-Rocha, E. (2010). Caracterización histoquímica y morfológica de las larvas veliger de *Atrina maura* (Sowerby, 1835) durante su cultivo larvario. *Tesis de Maestría*. Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz B.C.S.
- Rodríguez-Jaramillo, M. C. (2004). Efecto de la temperatura sobre la gametogénesis en callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) (BIVALVIA: PINNIDAE). *Tesis de Maestría*. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN, La Paz B.C.S.
- Rojas, L. M., Vélez, A. y Azuaje, O. (1988). Efectos individuales y combinados de la densidad larval y la ración de alimento sobre la supervivencia y el crecimiento de la vieira *Pecten ziczac*. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, 27: 57–62.
- Romalde, J. L. (2012). Héroes y villanos: bacterias asociadas al cultivo de moluscos. *AquaTIC*, 37:45–59.
- Romalde, L., Barja, J. L. y Prado, S. (2010). Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. *Veterinary Microbiology*, 145: 187–197. doi: [10.1016/j.vetmic.2010.08.021](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.08.021)
- Ruiz, P. C., Samain, J.F., Sánchez, J.L. y Nicolas, J.L. (1999). The benefit of a Roseobacter species on the survival of scallop larvae. *Marine Biotechnology*, 1: 52-59. doi: [10.1007/PL00011751](https://doi.org/10.1007/PL00011751).
- Russell, N.J. Y Nichols, D.S. (1999). Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria: a dogma rewritten. *Microbiology*, 145: 767–779.
- Sánchez, A.C., Mazón, J.M., Flores, M C., Luna, A., Ochoa, N., Melgar, C.E. y Campa, A.I. (2020). Probiotic Bacterium and Microalga Interaction on Rearing Kumamoto Oyster *Crassostrea sikamea* Spat. *Current Microbiology*, 77: 2758-2765. doi: [10.1007/s00284-020-02076-2](https://doi.org/10.1007/s00284-020-02076-2)

- Sánchez, L. C. y Martínez, P. I. (2014). Effects of different mono, bi and trispecific microalgal diets on survival, growth, development, settlement and fatty acid composition of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) larvae. *Aquaculture*, 426:138-147. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.01.032
- Saucedo, P. E, González, J. A., Acosta, S. H., Mazón, J.M. y Ronsón, J.A. (2013). Nutritional value of microalgae-based diets for lions-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) juveniles reared at different temperatures. *Aquaculture*, 392: 113-119. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.02.001
- Sheehan, D. C. y Hrapchak, B.B. (1980). *Theory and practice of histotechnology*. 2nd ed. Mosby, St. Louis: 481 pp.
- Soto-Simental, L. (2015). Uso de Probióticos como alternativa para el control de vibrios en la crianza del hacha china *Atrina maura*. *Tesis de Maestría*. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN, La Paz, B.C.S.
- Stott, A.E., Takeuchi, T. y Koike, Y. (2004). An alternative culture system for the hatchery production of abalone without using live food. *Aquaculture*, 236: 341–360. doi: [10.1016/j.aquaculture.2004.03.008](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.03.008)
- Subashchandrabose, S.R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K. y Naidu, R. (2011). Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. *Biotechnology Advances*, 29:896–907. doi: [10.1016/j.biotechadv.2011.07.009](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.009)
- Sulkin, S.D. (1984). Behavioral basis of depth regulation in the larvae of brachyuran crabs. *Marine Ecology Progress Series*, 15:181-205. doi: 10.3354/meps015181.
- Summa, D., Lanzoni, M., Castaldelli, G., Fano, E.A. y Tamburini, E. (2022). Trends and opportunities of bivalve shells' waste valorization in a prospect of circular blue bioeconomy. *Resources*, 11: 48. doi:10.3390/resources11050048
- Thieltges, D. W. y Rick, J. (2006). Effect of temperature on emergence, survival and infectivity of cercariae of the marine trematode *Renicola roscovita* (Digenea: Renicolidae). *Diseases of Aquatic Organisms*, 73:63–68. doi: 10.3354/dao073063
- Trigos, S., Vicente, N., Prado, P. y Espinos, F.J. (2018). Adult spawning and early larval development of the endangered bivalve *Pinna nobilis*. *Aquaculture*, 483(2–3): 102-110. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.10.015
- Troost, K., Veldhuizen, R., Stamhuis, E. J. y Wolff, W. J. (2008). Can bivalve veligers escape feeding currents of adult bivalves? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 358(2): 185-196. doi: [10.1016/j.jembe.2008.02.009](https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.02.009)
- Velasco-Blanco, G. (1997). Cultivo larvario a nivel piloto del callo de hacha *Atrina maura* Sowerby y de la almeja mano de león *Lyropecten subnodosus* Sowerby con dos especies de microalgas. *Tesis de Maestría*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, Baja California.
- Venkat, H.K., Shau, N.P. y Jain, K.J. (2004). Effect on feeding Lactobacillus-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research*, 35: 501-507. doi: 10.1111/j.1365-2109.2004.01045.x
- Verschuere, L., Rombaut, G., Huys, G., Dhont, J., Sorgeloos, P. y Verstraete, W. (1999). Microbial control of the culture of artemia juveniles through preemptive colonization by selected bacterial strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2527–2533.
- Villalba, A., Mourelle, S., López, M., Carballal, M. y Azevedo, C. (1993). Marteiliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galicia (NW Span). I. Etiology, chases of the infection, and temporal and spatial variability in prevalence. *Diseases of Aquatic Organisms*, 16:61–72.

- Viso, A.C., Pesando, D. y Baby, C. (1987). Antibacterial and antifungal properties of some marine diatoms in culture. *Botánica Marina*, 30: 41-45. doi: 10.1515/botm.1987.30.1.41.
- Waite, J.H., Wilbur, K. M. (1976). Phenoloxidase in periostracum of marine bivalve *Modiolus demissus dillwyn*. *Journal of Experimental Zoology*, 195:359–367.
- Yazawa, K., Araki, K., Okazaki, N., Watanabe, K., Ishikawa, C y Inoue, A. (1988). Production of eicosapentaenoic acid by marine bacteria. *Journal of Biochemistry*, 103: 5–7. doi: [10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122238](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122238)
- Yee-Duarte, J. A., Arellano-Martínez, M., Roldán-Wong, N. T., Kidd, K. A. y Ceballos-Vázquez, B. P. (2024). Reduction in reproductive activity from degeneration of testicular follicles in *Megapitaria squalida* (Mollusca: Bivalvia) exposed to metal pollution in the Gulf of California. *Marine Pollution Bulletin*, 205:116648. doi: [10.1016/j.marpolbul.2024.116648](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.116648)
- Zannella, C., Mosca, F., Mariani, F., Franci, G., Folliero, V., Galdiero, M. y Galdiero, M. (2017). Microbial diseases of bivalve mollusks: infections, immunology and antimicrobial defense. *Marine drugs*, 15(6): 182. doi: [10.3390/md15060182](https://doi.org/10.3390/md15060182)
- Zaroogian, G. y Yevich, P. (1994). The nature and function of the brown cell in *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research*, 37:355–373. doi: [10.1016/0141-1136\(94\)90036-1](https://doi.org/10.1016/0141-1136(94)90036-1)
- Zhou, Q., Li, K., Jun, X. y Bo, L. (2009). Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture. *Bioresource Technology*, 100(16): 3780-3786. doi: 10.1016/j.biortech.2008.12.037
- Ziaei, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovet, D.L., Mirvaghefi, A.R. y Shakouri, M. (2006). The effect of *Bacillus spp* bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, 252(2–4):516–524. doi: [10.1016/j.aquaculture.2005.07.021](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.021).
- Zorita, I., Ortiz, M., Soto, M. y Cajaraville, M. P. (2006). Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): an integrated biochemical, histochemical and histological study. *Aquatic Toxicology*, 78:S109–S116. doi: [10.1016/j.aquatox.2006.02.032](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.02.032)